



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2011

**Dora Cristina Silva
Costa**

**Síntese e avaliação biológica de novos derivados
porfirínicos**



**Dora Cristina Silva
Costa**

**Síntese e avaliação biológica de novos derivados
porfirínicos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química, Ramo Química Orgânica e Produtos Naturais, realizada sob a orientação científica do Doutor João Paulo Costa Tomé, Investigador Auxiliar e co-orientação do Professor José Abrunheiro da Silva Cavaleiro, Professor Catedrático, ambos do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Apoio financeiro da FCT no âmbito do projeto PTDC/QUI/65228/2006, financiado pelo COMPETE e FEDER.

Aos meus pais e ao meu irmão, pelo
amor, apoio e dedicação incondicionais.

A beleza da vida não reside na
permanente e fácil iluminação, mas sim
na conversão da penumbra (ou mesmo
total escuridão) na luz exata de ativação.

o júri

Presidente

Doutor Artur Manuel Soares Silva

Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor José Abrunheiro da Silva Cavaleiro

Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor João Paulo Costa Tomé

Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Mário José Ferreira Calvete

Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Coimbra

agradecimentos

Ao Doutor João Tomé, orientador desta tese, por todo conhecimento científico transmitido, apoio e disponibilidade sempre demonstrados.

Ao Professor José Cavaleiro, co-orientador desta tese, por ter aceitado e auxiliado neste trabalho.

À Professora Adelaide Almeida que, mesmo não sendo minha orientadora, esteve sempre disponível e me auxiliou em todo trabalho relacionado com os ensaios biológicos.

À Professora Maria do Amparo Faustino, pela ajuda e sugestões sempre pertinentes na realização e interpretação dos estudos fotofísicos.

A ti Maria Clara, pela ajuda e apoio incondicional que sempre me brindaste. O meu muito obrigada por teres estado sempre tão presente, principalmente quando a clarividência e a força anímica escasseavam. Mais que muito amigas, quase uma irmã te tornaste.

A todo o pessoal do laboratório de Química Orgânica, de um modo especial à Cláudia e à Lipa, à Joana Brás, ao João, ao Leandro, à Teresa, à Sónia, à Andreia e ao Flávio, pela ajuda e pelo apoio, mas principalmente pela amizade e paciência (o mais difícil, admito), sempre presentes.

À “malta” do laboratório da Biologia, de modo especial à Carla, por me terem ensinado que os biólogos não têm de ser sempre intrinsecamente “cinzentos”, tendo-se revelado ótimos colegas de trabalho multidisciplinar.

Aos meus restantes amigos, de um modo especial à Carina (que mesmo estando longe, sempre te mostraste perto) e à Su (por te teres revelado muito mais que uma afilhada).

À Universidade de Aveiro pelo financiamento do QOPNA e CESAM.

À FCT (Lisboa) e FEDER pelo financiamento do QOPNA.

Ao Projeto PTDC/QUI/65228/2006 pelo financiamento parcial do trabalho experimental.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra fizeram parte destes dois últimos anos da minha vida, e deixaram a sua marca.

Por fim, à minha mãe e ao meu irmão, por todo o amor e carinho, apoio e total dedicação e paciência. Por me terem ensinado a nunca desistir e a dar devido valor a cada conquista, ainda que aparentemente pequena.

palavras-chave

Porfirinas catiónicas, clorinas, *orto*-quinonas metídeo, microrganismos patogénicos multirresistentes, PDT, aPDT.

resumo

O presente trabalho descreve a síntese, caracterização e avaliação biológica de novos macrociclos porfirínicos na fotoinativação de estirpes bacterianas resistentes a antibióticos, de origem clínica.

Para tal, sintetizaram-se dois derivados tetra-substituídos da *meso*-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina: uma porfirina (fotossensibilizador de “1.^a geração”) e a clorina correspondente (fotossensibilizador de “2.^a geração”). Ambos os compostos foram posteriormente cationizados com iodeto de metilo, originando os correspondentes derivados tetra-catiónico, no caso da porfirina, e penta-catiónico caso da clorina.

Os compostos sintetizados foram caracterizados estruturalmente com recurso à espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão, e de flúor 19, assim como de ultravioleta-visível e espectrometria de massa. A caracterização estrutural efetuada confirmou a estrutura esperada de cada um dos compostos.

Ambos os fotossensibilizadores foram testados em ensaios biológicos para avaliação da sua capacidade de inibição de estirpes bacterianas, do tipo Gram-negativa [Gram (-)], *Pseudomonas aeruginosa*, e Gram-positiva [Gram (+)], *Staphylococcus aureus*. Tais estudos foram, paralelamente, realizados e comparados com os resultados obtidos para um fotossensibilizador já amplamente estudado por vários autores, designadamente, a 5,10,15,20-tetraquis(N-metilpiridínio)porfirina. Os ensaios de fotoinativação antimicrobiana foram levados a cabo usando dois tipos de luz – uma luz branca e uma luz vermelha, sendo esta última uma radiação de comprimento de onda mais elevado (> 550 nm), logo mais penetrante, podendo por isso ser usada no tratamento de lesões mais profundas –, usando uma intensidade de 150 mW.cm⁻².

Os resultados obtidos permitem afirmar que ambas as estirpes, mesmo sendo resistentes a antibióticos, não apresentam resistência à inativação fotodinâmica antimicrobiana. Mais se observa que a estirpe do tipo Gram (+) apresenta maior sensibilidade ao processo de fotoinativação que a estirpe do tipo Gram (-). O derivado do tipo clorina mostrou ser o mais eficaz, na inativação da estirpe Gram (+), inativando-a até ao limite de deteção (0.5 µM, 15 min, luz branca e 30 min, luz vermelha). A clorina mostrou também resultados promissores inativando, quase até ao limite de deteção, a estirpe Gram (-) (10 µM, 60 min), para a luz branca e até ao limite de deteção (10 µM, 1.5 h), para a luz vermelha. Assim a luz vermelha mostrou ser promissora quando combinada com fotossensibilizadores de “2.^a geração” do tipo clorina, no tratamento de infeções mais profundas provocadas por microrganismos do tipo referido.

keywords

Cationic porphyrins, chlorins, *ortho*-quinones methide, multiresistant microorganisms, PDT, aPDT.

abstract

The present work describes the synthesis, characterization and biological evaluation of new porphyrin macrocycles in photoinactivation of multiresistant bacterial strains of clinical origin, resistant to at least three different families of antibiotics).

For this purpose we synthesized two derivatives of the tetra-substituted *meso*-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin: a porphyrin and a chlorin. Both derivatives were later cationized with methyl iodide, leading to a tetra-cationic porphyrin ("1st generation" photosensitizer) and a penta-cationic chlorin ("2nd generation" photosensitizer).

All the synthesized compounds were characterized using the nuclear magnetic resonance spectroscopy of proton and fluorine 19, as well as ultraviolet-visible spectroscopy and mass spectrometry. The structural characterization carried out confirmed the expected structure for each compound.

Both photosensitizers were tested in biological assays to evaluate its ability to inhibit multiresistant bacterial strains, the Gram-negative [Gram (-)] *Pseudomonas aeruginosa*, and the Gram-positive [Gram (+)] *Staphylococcus aureus*. These studies were, in parallel, made and compared with results obtained for a photosensitizer been widely studied by several authors, the 5,10,15,20-tetrakis(N-metilpiridínium-il)porphyrin. The antimicrobial photoinactivation tests were carried out using two types of lights – a white light and a red light, the latter with a higher radiation length (> 550 nm) and therefore more penetrating, can probably be used in the treatment of deeper lesions – using a fluence rate of 150 mW.cm⁻².

The results have revealed that both strains, even though multidrug resistant, have no resistance to antimicrobial photodynamic therapy. More, it can be seen that the Gram (+) strain is more sensitive to the inhibition process in relation to the Gram (-) type. The chlorin derivative showed to be the most effective photosensitizer on the inactivation of Gram (+) bacteria, inactivating it to the limit of detection (0.5 µM, 15 min, white light and 30 min, red light). The same derivative, also showed important inactivation results against to the Gram (-) one (10 µM, 60 min), for the white light and to the limit of detection (10 µM, 1.5 h), for the red light. So the red light shown be promising, when combined with the "2nd generation" photosensitizers chlorin-type, on the treatment of bacterial infections in deeper tissues caused by microorganisms of the referred type.

Índice

AGRADECIMENTOS.....	I
RESUMO.....	III
ABSTRACT	V
ABREVIATURAS.....	IX
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Macrociclos tetrapirrólicos – Breves considerações	3
1.2. Nomenclatura e definições estruturais dos macrociclos tetrapirrólicos.....	4
1.3. Aromaticidade e propriedades físico-químicas do macrociclo.....	4
1.4. Reatividade do macrociclo porfirínico	6
1.5. Síntese de porfirinas <i>meso</i> -substituídas	7
1.5.1. Síntese de porfirinas <i>meso</i> -substituídas simétricas.....	8
1.6. Síntese de clorinas.....	11
1.6.1. Redução de porfirinas.....	11
1.6.2. Oxidação de porfirinas.....	12
1.6.3. Reações de cicloadição	13
1.6.3.1. Reação de Diels-Alder	14
1.6.3.2. Reação de dicloadição 1,3-dipolar	15
1.7. Aplicações.....	18
1.7.1. Terapia fotodinâmica	19
1.7.2. Terapia fotodinâmica antimicrobiana.....	21
1.7.2.1. Porphirinas como agentes antimicrobianos.....	22
1.7.2.1.1. Área clínica.....	23
1.7.2.1.2. Área ambiental.....	24
1.7.2.2. Clorinas como agentes antimicrobianos	25
1.7.2.3. Fotoinativação de células bacterianas	26
1.7.2.3.1. Bactérias multirresistentes	28
1.7.2.4. O fotossensibilizador	29
1.7.2.5. A luz.....	30
1.7.3. Mecanismos associados ao efeito fotodinâmico	31
CAPÍTULO II – SÍNTESE DE PORFIRINAS E CLORINAS MESO-TETRA-SUBSTITUÍDAS.....	35
2.1. Introdução.....	37
2.2. Síntese de porfirinas <i>meso</i> -tetra-substituídas.....	39
2.2.1. Síntese da <i>meso</i> -tetraquis(pentafluorofenil)porfirina.....	39
2.2.2. Síntese da porfirina 2.2	41
2.2.3. Síntese da porfirina 2.3	42
2.2.4. Cationização da porfirina 2.2	46
2.2.5. Cationização da porfirina 2.3	47
2.3. Síntese de clorinas <i>meso</i> -tetra-substituídas	49
2.3.1. Síntese da <i>meso</i> -tetraquis(pentafluorofenil)clorina.....	49
2.3.2. Síntese da clorina 2.9	51
2.3.3. Cationização da clorina 2.9	52
2.3.4. Reações da TPPF ₂₀ com <i>orto</i> -quinonas metídeo	55
2.4. Parte experimental.....	59
2.4.1. Reagentes e Equipamento	59
2.4.2. Procedimentos.....	60
2.4.2.1. Síntese da porfirina 2.1	60

2.4.2.2.	Síntese da porfirina 2.2	60
2.4.2.3.	Síntese da porfirina 2.3	61
2.4.2.4.	Cationização da porfirina 2.2	61
2.4.2.5.	Cationização da porfirina 2.3	62
2.4.2.6.	Síntese da clorina 2.7	62
2.4.2.7.	Síntese da clorina 2.9	63
2.4.1.1.	Cationização da clorina 2.9	64
CAPÍTULO III – AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DOS DERIVADOS CATIÓNICOS.....		65
3.1.	Introdução.....	67
3.2.	Materiais e Métodos.....	68
3.2.1.	Fotossensibilizadores	68
3.2.2.	Estirpes bacterianas, condições de crescimento e preparação das suspensões stock	69
3.2.3.	Ensaio de aPDT.....	70
3.2.4.	Condições de irradiação.....	70
3.2.5.	Quantificação das unidades formadoras de colónias (UFCs).....	70
3.2.6.	Controlos	71
3.2.7.	Estudos de fotoestabilidade dos fotossensibilizadores testados	71
3.2.8.	Estudos de agregação.....	71
3.2.9.	Estudos de geração de oxigénio singuleto	72
3.2.10.	Rendimento quântico de fluorescência.....	72
3.2.11.	“Uptake”	73
3.3.	Resultados	73
3.3.1.	Ensaio de fotoinativação de estirpes bacterianas	73
3.3.1.1.	<i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> sob irradiação de luz branca	73
3.3.1.2.	<i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> sob irradiação de luz vermelha	74
3.3.2.	Estudos de agregação e fotoestabilidade dos PSs testados.....	76
3.3.2.	Estudos de produção de oxigénio singuleto	79
3.3.3.	Rendimento quântico de fluorescência.....	79
3.3.4.	“Uptake”	80
3.4.	Discussão	81
CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES		83
REFERÊNCIAS.....		87

Abreviaturas

ALA	ácido <i>delta</i> -aminolevulínico
aPDT	terapia fotodinâmica antimicrobiana
Ar	arilo
d	duplete
dd	duplo duplete
ddd	duplo duplete de dupletos
DDQ	2,3-diciano-5,6-diclorobenzoquinona
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DPBF	1,3-difenilisobenzofurano
EM	espetrometria de massa
eq.	equivalente
ESI	ionização por “electrospray”
EUA	Estados Unidos da América
Gram (-)	Gram-negativa
Gram (+)	Gram-positiva
Hp	hematoporfirina
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HMBC	correlação espectroscópica heteronuclear, bidimensional, em RMN
IPO	Instituto Português de Oncologia
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
<i>J</i>	constante de acoplamento
Log	logaritmo de base 10
m	multiplete
m/z	razão massa/carga
MALDI	“ <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i> ”
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
<i>m</i> -THPC	<i>meso</i> -Tetraquis(<i>m</i> -hidroxifenil)clorina
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	tampão fosfacto salino
PDT	terapia fotodinâmica
Ph	fenilo

PH ₂	macrociclo porfirínico livre
PMNP	<i>Polymyxin B nanopeptide</i>
ppm	partes por milhão
PS	fotossensibilizador
Py	piridina
QOPNA	Química Orgânica, Produtos Naturais e Agroalimentares
R _f	factor de retenção (retardamento)
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹⁹ F	ressonância magnética nuclear de flúor 19
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de protão
RMN	ressonância magnética nuclear
ROS	espécies reativas de oxigénio
rpm	rotações por minuto
RQF	rendimento quântico de fluorescência
s	singuleto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	dodecil sulfato de sódio
t	triplete
t.a.	temperatura ambiente
td	triplo duplete
TFA	ácido trifluoroacético
TLC	cromatografia em camada fina
TMP	<i>meso</i> -tetrametilporfirina
TMS	tetrametilsilano
TOF	analisador de tempo de voo
TPP	<i>meso</i> -tetrafenilporfirina
TPPF ₂₀	<i>meso</i> -tetraquis(pentafluorofenil)porfirina
TSA	“tryptic soy agar”
TSB	“tryptic soy broth”
UFC	unidade formadora de colónias
UV-vis	ultravioleta-visível
δ	desvio químico em ppm
λ	comprimento de onda
λ _{max}	comprimento de onda ao qual a absorvência é máxima

Capítulo I

Introdução

1.1. Macrociclos tetrapirrólicos – Breves considerações

Os macrociclos tetrapirrólicos, nomeadamente as porfirinas e seus análogos, fazem parte da extensa e importante variedade de produtos naturais.¹ Este tipo de compostos fazem parte de animais e plantas, assumindo um papel fundamental em funções vitais como a respiração, fotossíntese, transporte de eletrões, diversas ações enzimáticas e em processos de desintoxicação.² Assim, pode afirmar-se que os referidos compostos são cruciais para a existência de vida na Terra, tal como a conhecemos.³

Como exemplo, poderemos desde logo destacar o grupo heme (**1.1**, Figura 1.1) e as clorofilas (**1.2**, Figura 1.1). O grupo heme, protoporfirina IX complexada com ferro, é o grupo prostético da hemoglobina, responsável pelo transporte do oxigénio nos tecidos celulares. Este grupo pode também ser encontrado nas peroxidases, responsáveis pela catálise da oxidação de substratos com peróxido de hidrogénio, bem como nos citocromos, responsáveis pelo transporte de eletrões, pela biossíntese de esteroides e por mecanismos de desintoxicação.⁴ As clorofilas, sendo pigmentos responsáveis pela fotossíntese, possuem uma forma estrutural semelhante à do grupo heme. No entanto, o macrociclo encontra-se reduzido e coordenado com magnésio possuindo também diferentes grupos substituintes, estando estes de acordo com a função que desempenham.

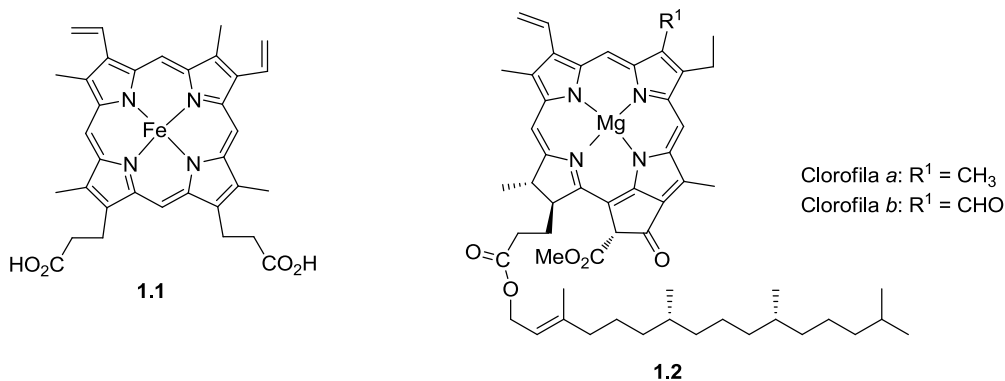


Figura 1.1 – Estruturas do grupo heme **1.1** e das clorofilas *a* e *b* **1.2**.

O enorme interesse estrutural, funcional e mecanístico dos sistemas biológicos que contêm macrociclos tetrapirrólicos, tem permitido alcançar relevantes descobertas nos últimos anos.¹ Este tipo de compostos surgem, assim, como agentes promissores em áreas como as de catálise, catálise enzimática, modelos de sistemas fotossintéticos, semicondutores e supercondutores, fungicidas, inseticidas, na Terapia fotodinâmica (PDT), e terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT).⁵⁻¹⁵

1.2. Nomenclatura e definições estruturais dos macrociclos tetrapirrólicos

Os macrociclos tetrapirrólicos são compostos aromáticos altamente conjugados, constituídos por quatro anéis de pirrol ligados por pontes metínicas. Caso se apresentem na sua forma totalmente insaturada possuem a designação de porfirinas.

Atualmente podem ser distinguidos dois sistemas de nomenclatura para estes macrociclos. Um proposto por H. Fischer e outro, bem mais recente, proposto pela IUPAC (Figura 1.2). No primeiro dos referidos sistemas (Figura 1.2 (a)), os carbonos externos dos anéis pirrólicos são numerados de 1 a 8 – posições também designadas por β -pirrólicas. As pontes metínicas (posições interpirrólicas) são designadas pelas letras gregas α , β , γ , δ e são também designadas por posições *meso*. No sistema proposto pela IUPAC (Figura 1.2 (b)) os átomos que fazem parte do macrociclo são numerados de 1-24. Os hidrogénios ligados aos átomos de azoto, por convenção, encontram-se no N-21 e N-23. No entanto, as designações *meso* e β -pirrólicas continuam a ser largamente utilizadas.¹⁴⁻¹⁷

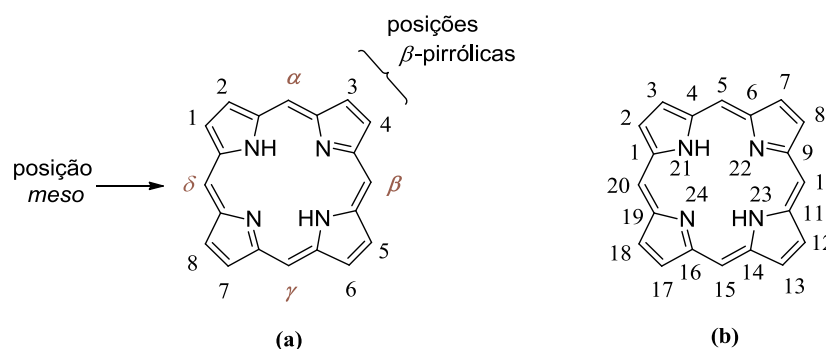


Figura 1.2 – Nomenclatura das porfirinas proposta por H. Fischer (a) e pela IUPAC (b).

1.3. Aromaticidade e propriedades físico-químicas do macrociclo

Como já foi mencionado, o macrociclo porfirínico encontra-se totalmente insaturado e é altamente conjugado, permitindo a existência de estruturas de ressonância.^{18,19} Este anel contém vinte e dois elétrons π conjugados mas apenas dezoito deles são suscetíveis de se deslocalizarem – o que está de acordo com a lei de Huckel ($4n + 2$ elétrons π) –, assegurando o seu caráter aromático. Assim, os quatro elétrons π restantes podem reagir e formar clorinas **1.3** – perda de uma dupla ligação –, bacterioclorinas **1.4** – perda de duas duplas ligações em anéis pirrólicos opostos –, ou isobacterioclorinas **1.5** – perda de duas duplas ligações em anéis pirrólicos adjacentes –

sem qualquer perda de aromaticidade (Figura 1.3). É de sublinhar que as clorinas, bacterioclorinas e isobacterioclorinas são, tal como as porfirinas, macrociclos aromáticos onde persistem os dezoito elétrons π conjugados.²⁰

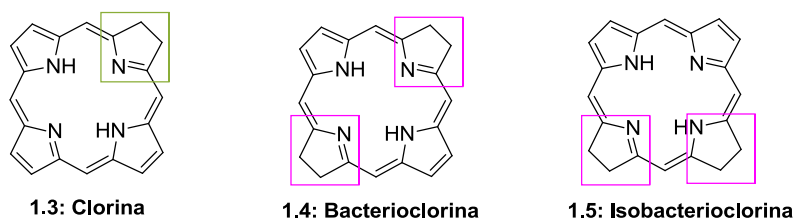


Figura 1.3 – Estrutura geral de três derivados tetrapirrólicos: clorina **1.3**, bacterioclorina **1.4** e isobacterioclorina **1.5**.

A elevada conjugação destes compostos confere-lhes uma das características mais relevantes, nomeadamente o seu espectro Ultravioleta-visível (UV-vis) que explica as suas magníficas cores intensas, que nos deixam de alguma forma esteticamente impressionados. A espectroscopia de absorção no UV-vis permite, assim, distinguir diferentes membros desta família. Este tipo de espectros apresenta principalmente duas regiões distintas: uma, entre 390 – 425 nm, onde se observa uma forte banda de absorção denominada de Banda Soret ou Banda B (característica da deslocalização dos 18 elétrons π); outra, situada entre 480 – 700 nm, onde se encontram normalmente 2 a 4 bandas Q, de intensidade menor e variável – (Figura 1.4).²¹

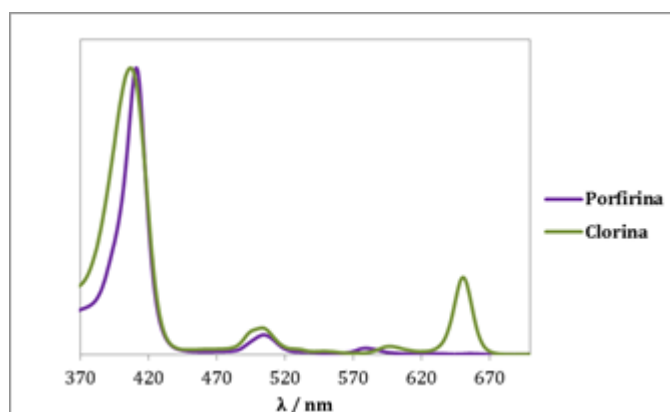


Figura 1.4 – Espectros de absorção no UV-vis de derivados porfirínicos.

A intensidade, posição e número destas bandas sofrem influência tanto dos substituintes do anel como do metal a que se encontram coordenadas. Assim, a complexação do anel geralmente aumenta a intensidade da banda Soret e reduz as bandas Q para duas. Os substituintes sacadores de elétrons também influenciam a posição das bandas, deslocando-as para maiores comprimentos de onda.²¹ A banda Soret

encontra-se no espectro de UV-vis de todos os macrociclos tetrapirrólicos que possuam um núcleo completamente conjugado.

Comparando a banda Soret das porfirinas com a das clorinas, compostos geralmente de coloração verde e com núcleos com uma unidade pirrólica reduzida, constata-se que a desta última é menos intensa. No entanto, a última banda Q das clorinas poderá estar deslocada 20 – 30 nm para a zona do vermelho do espectro de UV-vis e pode apresentar uma intensidade dez vezes superior face à correspondente banda nas porfirinas.²¹

As bacterioclorinas possuem uma banda de forte absorção na região dos 700 – 750 nm, ao passo que as isobacterioclorinas – na maioria dos casos de tonalidade cor-de-rosa – apresentam, para além de um conjunto de três bandas Q entre os 500 e 600 nm, uma banda de fraca intensidade a 650 nm.^{19,22}

No que respeita aos espectros de ressonância magnética nuclear de protão (RMN ¹H) dos compostos em análise, os mesmos evidenciam uma elevada e muito característica aromaticidade. Tal aromaticidade é responsável pelo aparecimento de sinais correspondentes a ressonância dos protões internos – NH a campos mais elevados (δ entre -2 e -5 ppm) do que o tetrametilsilano (TMS), enquanto que o sinal correspondente à ressonância dos protões metínicos surge a campos mais baixos ($\delta \approx 10$ ppm) devido ao efeito desprotector provocado pela corrente de anel gerada pelos eletrões π .^{21,23}

1.4. Reatividade do macrociclo porfirínico

Os núcleos porfirínicos poderão sofrer reações no interior ou nas posições periféricas do anel, nomeadamente as posições *meso* e as β -pirrólicas.

As porfirinas, no seu estado livre, apresentam propriedades ácido-base, resultando esta propriedade dos azotos pirrólicos, em que dois dos quatro azotos podem ganhar e outros dois poderão perder protões (Figura 1.5).²⁴

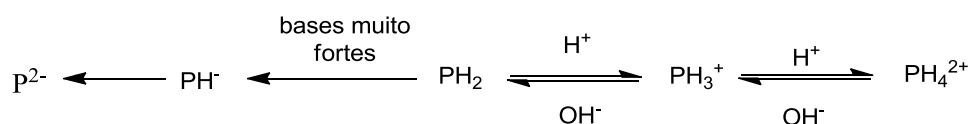


Figura 1.5 – Características ácido-base das porfirinas.

Os átomos azoto do interior do macrociclo são excelentes na coordenação de cátions metálicos, formando assim metaloporfirinas. Apesar de na natureza apenas se complexarem com alguns cátions metálicos – como o magnésio, ferro, zinco, manganês, cobre, níquel ou cobalto –, estes complexos têm vindo a ser estudados com quase todos os metais da tabela periódica.²⁵ As metaloporfirinas desempenham um papel importante em processos biológicos, como já referido no caso do grupo heme da hemoglobina ou das clorofilas. Os complexos metálicos das porfirinas podem sofrer uma grande variedade de reações, nomeadamente de substituição electrofílica aromática. A complexação das porfirinas com metais de baixa eletronegatividade aumenta a densidade eletrónica na periferia do anel porfirínico, convertendo-o, desse modo, numa espécie muito reativa em relação a moléculas electrofílicas. Além disso, o metal evita a protonação dos azotos pirrólicos e consequente formação do dicatión porfirínico não nucleofílico.^{21,24} Já os metais com elevada eletronegatividade são mais indicados para reações de redução e nucleofílicas.²¹

Quanto às reações que podem ocorrer na periferia do anel porfirínico, são elas reações electrofílicas, nucleofílicas, de oxidação e de redução. Também podem ocorrer reações nos grupos substituintes periféricos.²⁶ Normalmente, as posições *meso* são eletronicamente mais reativas que as posições β -pirrólicas. As transformações nos grupos substituintes periféricos são também um tipo de reação muito importante.²⁶

1.5. Síntese de porfirinas *meso*-substituídas

As porfirinas encontram-se na natureza, estando largamente disseminadas pelos reinos animal e vegetal. Assim, devido a esta imensa ocorrência e à importância biológica das porfirinas, muitos são os trabalhos desenvolvidos com o intuito de mimetizar determinadas funções naturais utilizando porfirinas.²⁷

A síntese de novos materiais porfirínicos através de intermediários pirrólicos pode ocorrer quer pela introdução de modificações em pigmentos naturais, quer pela derivatização de porfirinas já sintetizadas.²⁸⁻³⁰ Devido à existência de vários métodos de síntese de macrociclos tetrapirrólicos, abordaremos apenas, de forma breve, os processos de síntese de macrociclos porfirínicos do tipo estudado neste trabalho, *i.e.*, porfirinas *meso*-substituídas. Estas porfirinas podem ser sintetizadas por vários métodos, sendo o processo mais utilizado o da condensação de pirrol com um ou mais aldeídos.

1.5.1. Síntese de porfirinas *meso*-substituídas simétricas

A primeira síntese documentada de porfirinas *meso*-substituídas data de 1935, no trabalho desenvolvido por Rothemund *et al.* levaram a cabo a síntese da 5,10,15,20-tetrametilporfirina (TMP, Figura 1.6) recorrendo a uma condensação entre acetaldeído e pirrol, tendo, porém, obtido rendimentos muito baixos.²⁹

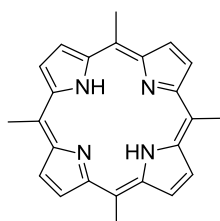
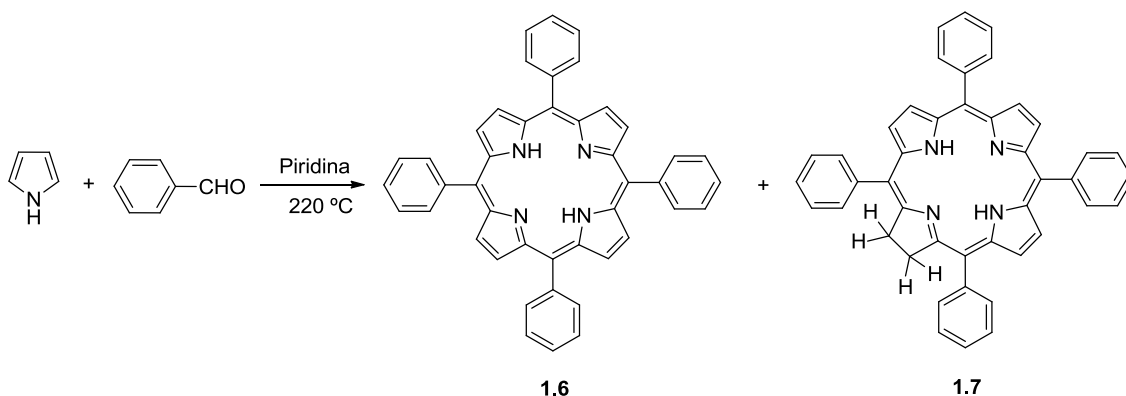


Figura 1.6 – Estrutura da 5,10,15,20-tetrametilporfirina (TMP).

Rothemund preparou mais de trinta porfirinas, entre as quais a 5,10,15,20-tetrafenilporfirina (TPP) **1.6** (Esquema 1.1). O seu método era bastante simples e consistia no aquecimento de pirrol e aldeído, em condições anaeróbias, a 220 °C, sob atmosfera de azoto durante 48 horas. No entanto, os rendimentos eram, como se disse, muito baixos (na ordem dos 5%) e a porfirina resultante surgiu contaminada com a correspondente clorina **1.7** (Esquema 1.1).²⁹



Esquema 1.1

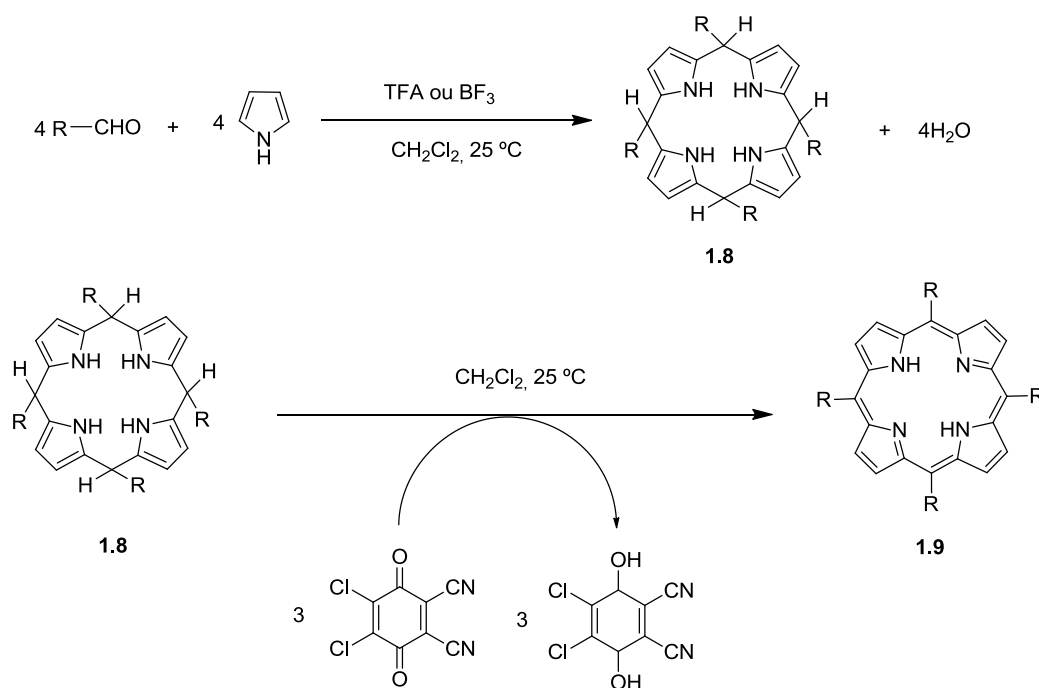
Mais tarde, Calvin e os seus colaboradores obtiveram o complexo de zinco da TPP com um rendimento 10% ao adicionarem acetato de zinco à mistura reacional de Rothemund.²⁴

Contudo, rendimentos da síntese da TPP na ordem dos 30-40% só foram obtidos nos anos 60 por Adler, Longo e Shergalis. Este novo método baseava-se na condensação de uma mistura equimolar de pirrol e benzaldeído em solventes ácidos, em refluxo e na presença de ar. Desse modo, o problema dos rendimentos muito baixos

acabou por ser solucionado. Por outro lado, a problemática associada à contaminação com a respetiva clorina veio a ser resolvido com a adição de quinonas à mistura porfirina/clorina. As quinonas começaram a ser usadas como agentes oxidantes de clorinas e porfirinogénios, pois o oxigénio do ar não se revelara suficientemente eficaz.^{30,31}

Entre 1979 e 1986, Lindsey e colaboradores desenvolveram um novo método de síntese que se baseava no facto de a formação do intermediário, o porfirinogénio **1.7**, ser termodinamicamente favorável quando o pirrol e o benzaldeído são condensados nas condições adequadas.³²

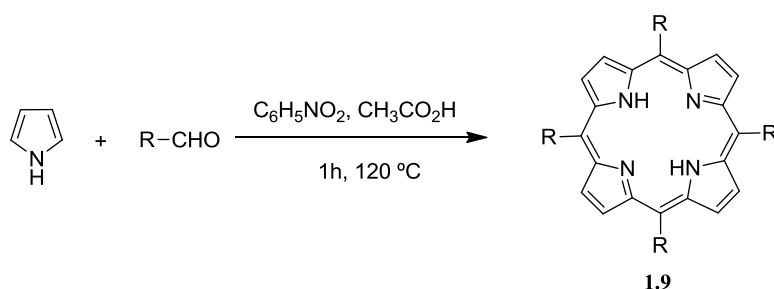
Este tipo de síntese é realizado em duas etapas: inicialmente, o pirrol e o aldeído condensam numa solução de diclorometano seca na presença de um catalisador ácido (BF_3 , TFA ou BCl_3) à temperatura ambiente, sob atmosfera de azoto e protegido da luz; numa segunda fase, o porfirinogénio formado é oxidado por adição de um agente oxidante (DDQ ou *p*-cloranil) o que originará a correspondente porfirina livre dos derivados reduzidos (Esquema 1.2).³²



Esquema 1.2

Atualmente, o método proposto por Rocha Gonsalves *et al.* é um dos mais usados. Este grupo propôs a utilização, como solvente, de uma mistura de ácido acético ou propiónico e nitrobenzeno (30%, v/v). Este último tem a função de oxidar o porfirinogénio formado, permitindo assim a preparação de porfirinas *meso*-tetra-

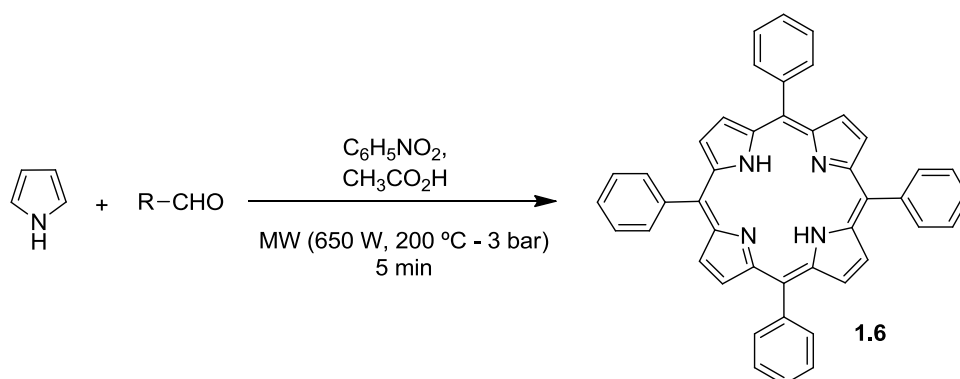
arilsubstituídas num só passo (**1.9**, Esquema 1.3). A reação decorre a 120 °C e leva apenas uma hora a ficar completa.³³



Esquema 1.3

Este novo método possibilita a preparação de porfirinas *meso*-tetra-arilsubstituídas com melhores rendimentos que os processos anteriormente apresentados, num único “passo”. Como prova do referido, veja-se que com este método a TPP é hoje facilmente preparada com um rendimento de aproximadamente 30%.

Recentemente, foi desenvolvido por Cavaleiro e os seus colaboradores um novo método que faz uso da radiação micro-ondas para promover a síntese da TPP, com um rendimento de 35% (**1.6**, Esquema 1.4). Como descrito na literatura sobre a matéria, o efeito da radiação micro-ondas não se resume apenas ao facto de se conseguir alcançar a temperatura desejada em menos tempo, mas também à circunstância de uma fonte de energia diferente pode afetar vários parâmetros físico-químicos. Os resultados conseguidos com a aplicação deste método, nomeadamente, no tempo poupado e no rendimento da síntese, tornam o uso desta radiação uma alternativa eficiente ao método de aquecimento clássico.³⁴



Esquema 1.4

1.6. Síntese de clorinas

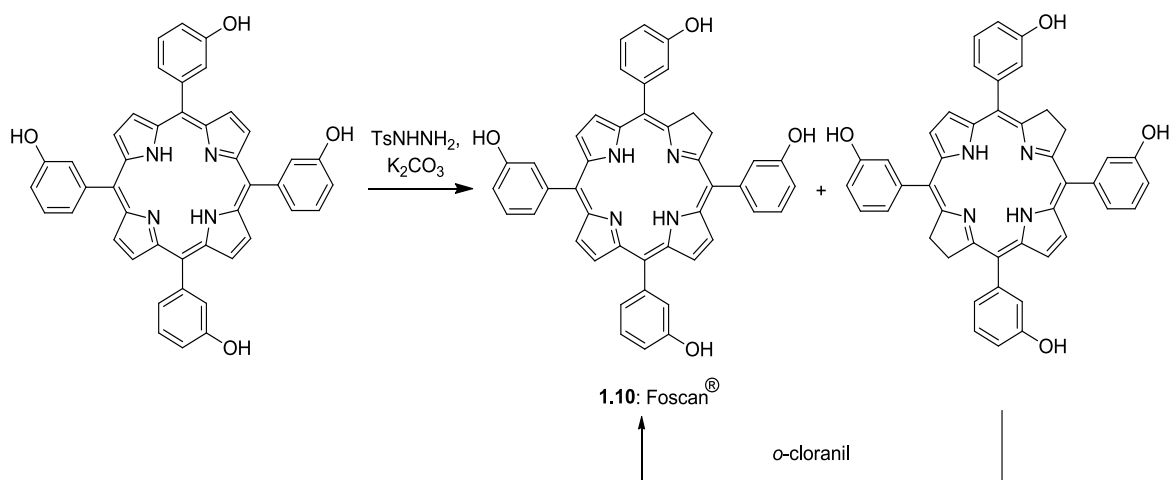
As clorinas (**1.3**, Esquema 1.3), são um grupo de compostos tetrapirrólicos, normalmente derivados de porfirinas, por saturação da dupla ligação que une duas das posições β . Apesar de porfirinas e clorinas terem muitas características em comum, o anel de pirrol na forma reduzida provoca uma alteração na simetria da molécula, bem como na sua conjugação, resultando daí alterações significativas nas suas propriedades, sendo mesmo cruciais para as diferentes aplicações destas duas famílias de macrociclos.

A síntese de clorinas pode ser levada a cabo através de síntese total, modificação de produtos naturais e ainda por derivatização de porfirinas.³⁵ Estas estratégias de síntese têm sido alvo de muitos estudos ao longo dos últimos anos. Contudo, nesta dissertação apenas serão expostas algumas rotas de síntese usadas na derivatização de porfirinas.

1.6.1. Redução de porfirinas

A redução de porfirinas é um dos métodos mais antigos para a preparação de clorinas. Através deste método, na presença de catalisadores, nomeadamente, de H_2/Pd ou *p*-toluenossulfonil-hidrazina, em meio básico, ocorre a transformação de porfirinas em clorinas.

Esta é a rota aplicada na síntese da *meso*-tetraquis(3-hidroxifenil)clorina (**1.10**: *m*-THPC: Foscan[®], Esquema 1.5).³⁶



Esquema 1.5

Seguindo a mesma metodologia, em 2008, foi preparado um derivado conjugado da *m*-THPC com ácido fólico. (**1.11**, Figura 1.7).³⁷

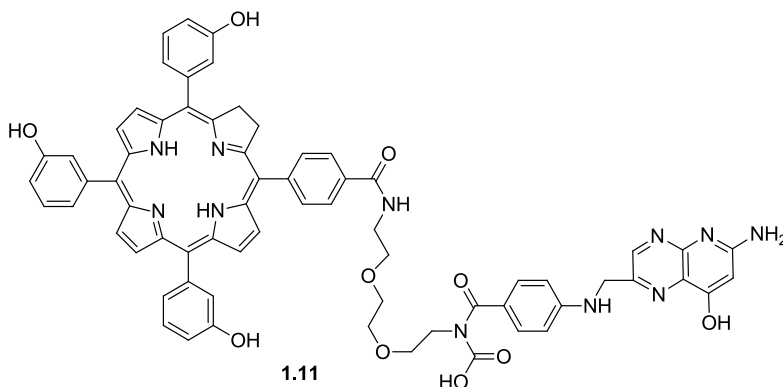
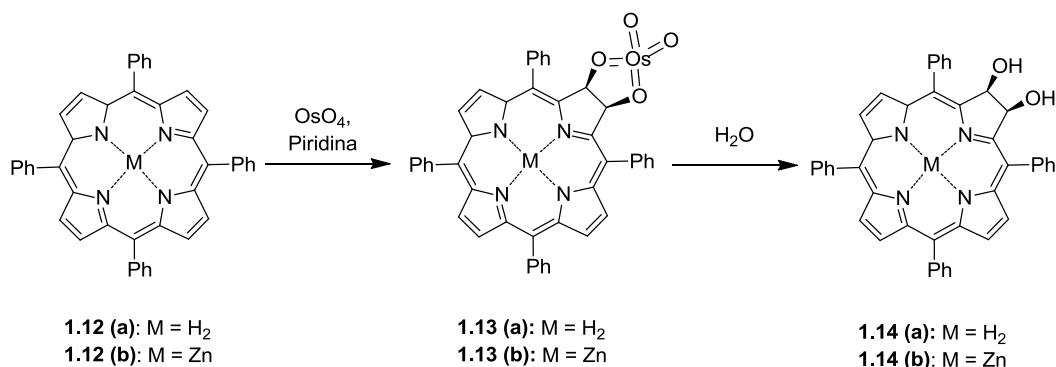


Figura 1.7 – Estrutura do conjugado clorina *m*-THPC - ácido fólico **1.11**.

1.6.2. Oxidação de porfirinas

Embora a oxidação de porfirinas, com tetróxido de ósmio (OsO_4) remonte aos anos 40, foi em 1995 que a oxidação de porfirinas *meso*-substituídas passou a ser conhecida, pela adição de uma quantidade estequiométrica de OsO_4 à TPP, formando-se a 2,3-*cis*-di-hidroxi-*meso*-tetrafenilclorina (Esquema 1.6).³⁶

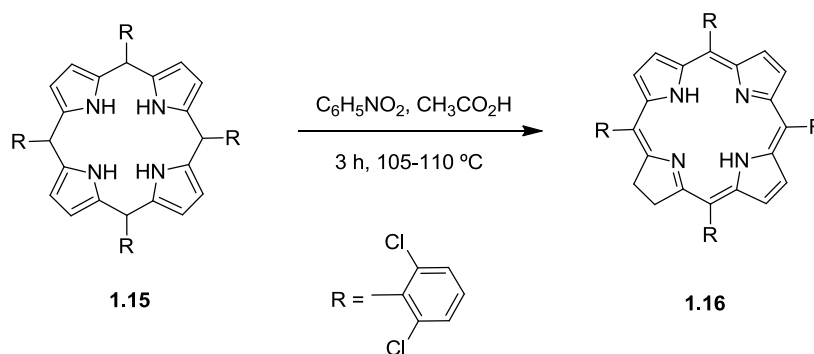
Este método foi empregue na síntese de outros derivados do tipo clorina. Contudo, o elevado custo dos reagentes utilizados e o perigo associado ao seu manuseamento fez com este método tenha vindo a ser descartado em detrimento de outras metodologias, nomeadamente as reações de cicloadição que serão explicitadas no ponto seguinte.



Esquema 1.6

Não obstante à mais ampla utilização de reações de cicloadição para este tipo de síntese, no passado ano de 2010, o grupo de Rocha Gonsalves, propôs para a síntese de clorinas um método semelhante ao publicado pelo mesmo grupo para síntese de tetra-

arilporfirinas. Recorrendo ao pirrol e ao benzaldeído, numa mistura de nitrobenzeno (em muito pequena quantidade) e anidrido acético/ácido acético, como solventes. Este grupo propõe então, a síntese da *meso*-tetraquis(2,6-diclorofenil)clorina, com rendimento de 63%, e a correspondente porfirina, com 37% de rendimento (**1.16**, Esquema 1.7).³⁸



Esquema 1.7

1.6.3. Reações de cicloadição

Uma das formas de derivatização de porfirinas assenta em reações de cicloadição. Tendo em conta que as clorinas são formas reduzidas de porfirinas, poderão sofrer oxidação durante o processo em que são empregues. Para tentar evitar isso, normalmente procede-se à redução de um dos anéis pirrólicos com substituintes volumosos ou anéis exocíclicos.

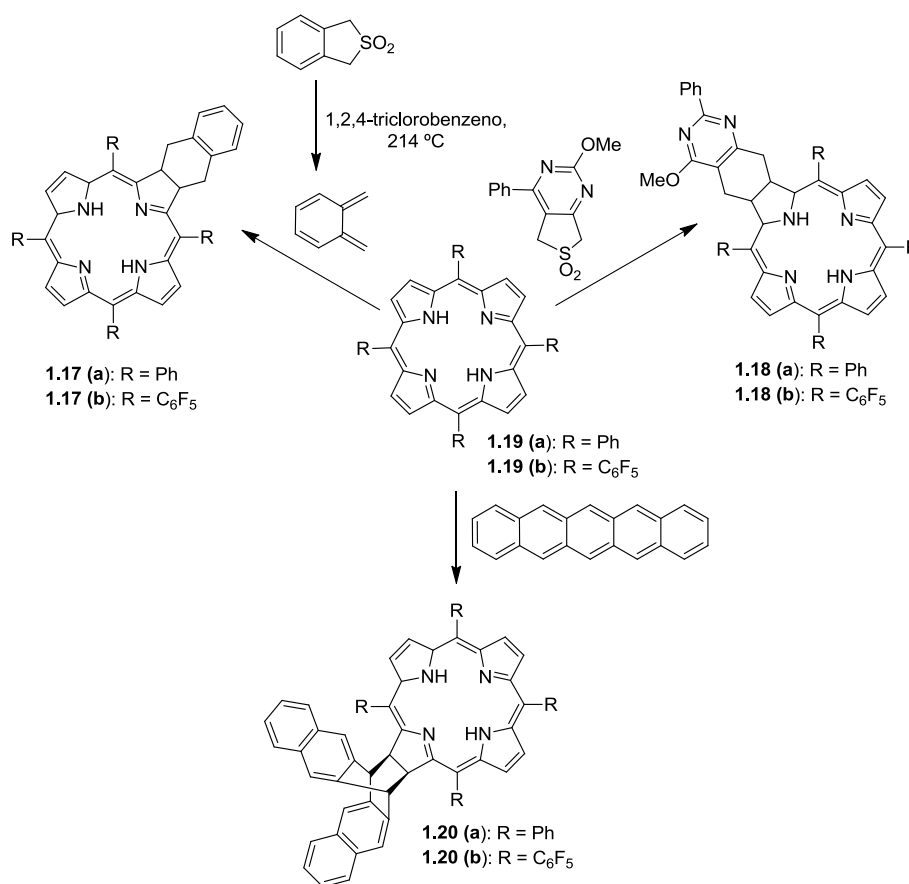
Uma reação de cicloadição pode ser definida como uma reação química pericíclica, na qual duas ou mais moléculas insaturadas (ou partes de uma mesma molécula) se combinam dando origem a um aducto cíclico – através da cisão de duas ligações π e a formação de outras duas ligações σ – resultando numa reação de ciclização. Este tipo de reação é, geralmente, classificado consoante o número de eletrões envolvidos. Assim, podemos referir vários tipos de reações de cicloadição, como por exemplo: as reações de Diels-Alder ou as reações 1,3-dipolar.

No que respeita às porfirinas com grupos substituintes específicos, podem participar em reações pericíclicas como dienos, dienófilos e ainda como dipolarófilos na preparação de clorinas. Apresentar-se-ão, de seguida, alguns dos trabalhos publicados nessa área.

1.6.3.1. Reação de Diels-Alder

A reação de Diels-Alder de porfirinas viniladas nas posições β -pirrólicas com dienófilos deficientes em elétrons é uma rota bastante versátil para a preparação de clorinas, assim como de isobacterioclorinas e bacterioclorinas sendo, nestes dois últimos casos, necessário o uso de porfirinas di-viniladas, como no caso da protoporfirina-IX, estudada pela primeira vez em 1980.^{39,40}

No final dos anos 90, Cavaleiro e os seus colaboradores estudaram reações de cicloadição usando a TPP e uma sulfona aromática, por aquecimento, em 1,2,4- α -triclorobenzeno, durante sete horas, formando-se três produtos: uma clorina fundida com um anel de tetra-hidronaftaleno, como produto maioritário, bem como duas outras naftoporfirinas, como produtos minoritários (Esquema 1.8).⁴¹ Mediante a aplicação de metodologias semelhantes com hidrocarbonetos policíclicos, como o pentaceno,³⁵ obtiveram-se também as clorinas correspondentes, como produtos maioritários (**120 (a)** e **120 (b)**, Esquema 1.8).^{3,42}



Esquema 1.8

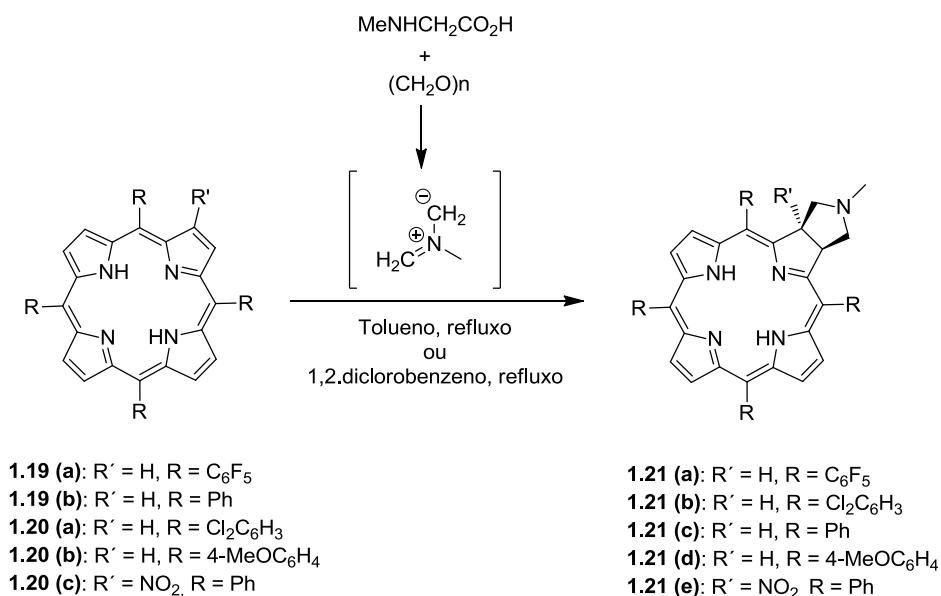
Assim, pode verificar-se que porfirinas simétricas *meso*-substituídas reagem como dienófilos em reações de Diels-Alder, originando os correspondentes aductos.³⁵

Contudo, este tipo de metodologia apresenta o sério inconveniente de não conseguir evitar a oxidação das clorinas formadas às respectivas porfirinas, o que se crê poder ser evitado através da introdução de grupos sacadores de eletrões nas porfirinas de partida.^{42,43}

1.6.3.2. Reação de dicloadição 1,3-dipolar

Como referido no início do ponto 1.6.3., as porfirinas podem também participar em reações de cicloadição 1,3-dipolar, sendo este o método que mais tem suscitado a curiosidade e trabalho da comunidade científica de determinadas áreas de síntese de clorinas.

Este grupo de macrociclos pode reagir com 1,3 dipólos, como iletos de azometino, nitronas, diazoalcanos e iletos carbonílicos dando origem a clorinas. Temos assim o exemplo do primeiro estudo publicado que visa o estudo da reatividade de porfirinas *meso*-substituídas com iletos de azometino, gerados *in situ* através de *para*-formaldeído e sarcosina,³ realizado, em 1999, por Cavaleiro *et al.*. Tal estudo provou que porfirinas com grupos sacadores de eletrões nas posições *meso* são mais reativas, originando clorinas com rendimentos elevados (Esquema 1.9).

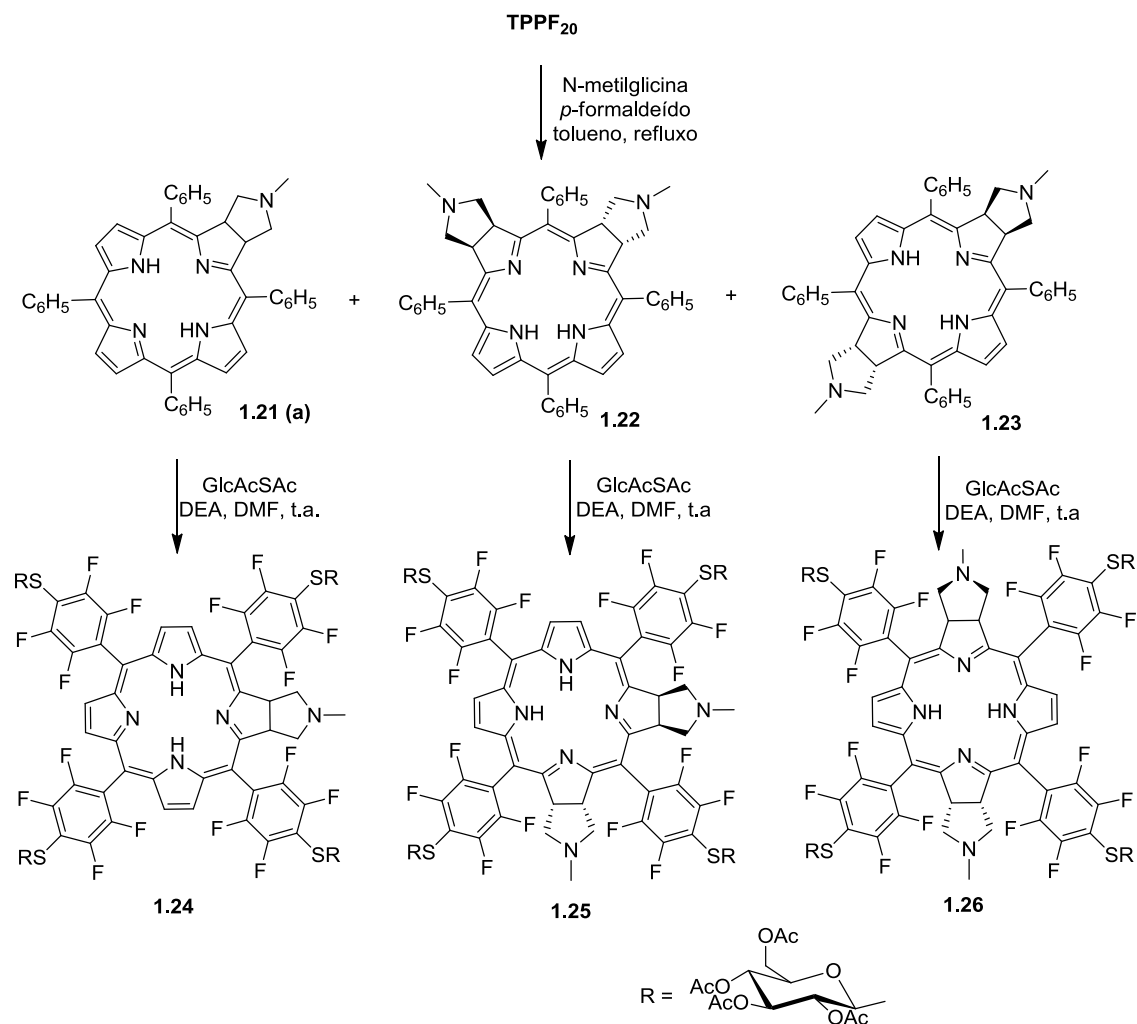


Esquema 1.9

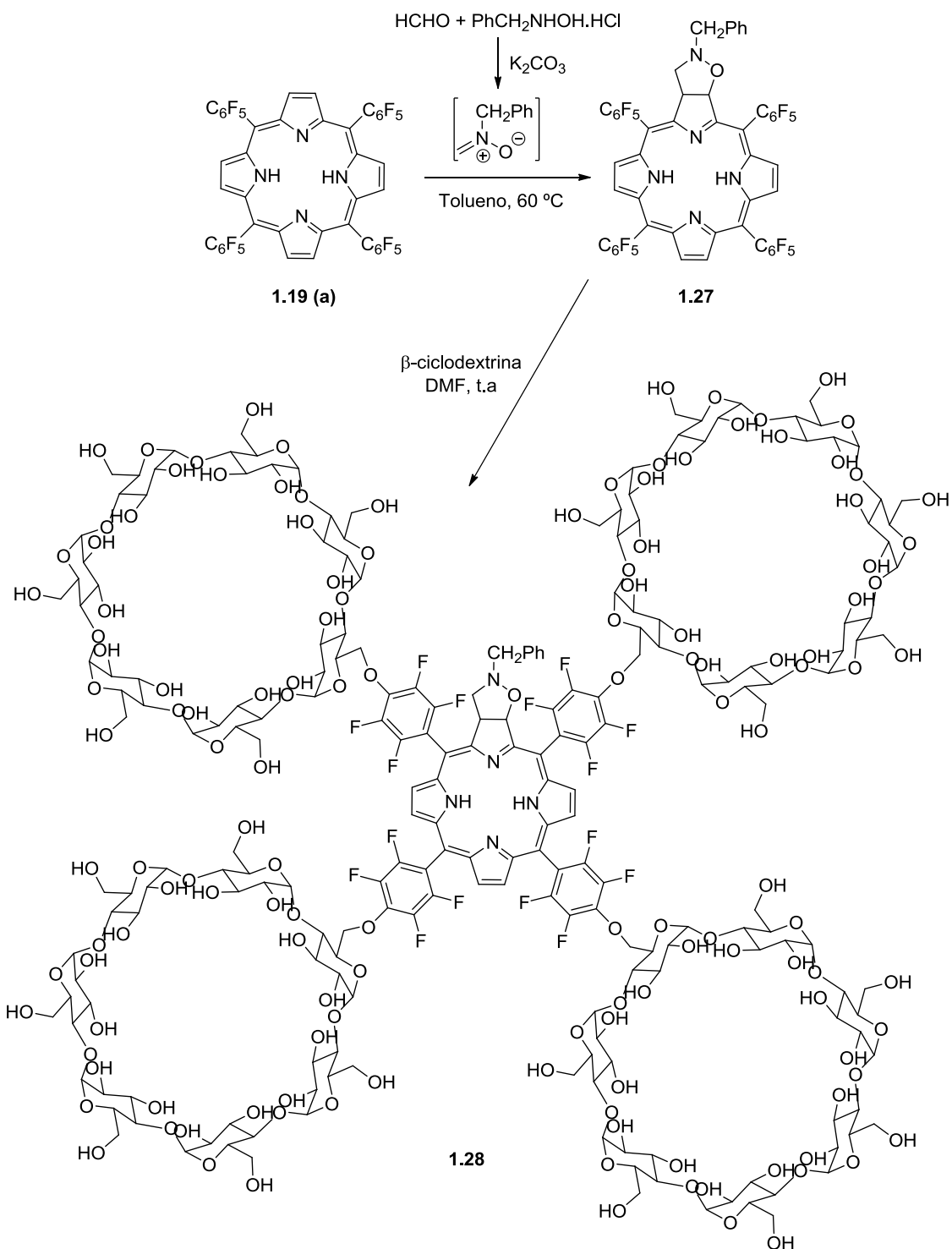
Estudos posteriores estenderam estas reações a outros aminoácidos – v.g. a prolina ou a hidroxiprolina – e a outros aldeídos aromáticos, assim como alifáticos, para preparação de um leque variado de clorinas.^{3,42}

O mesmo método de Cavaleiro *et al.* permitiu também a síntese de glicoclorinas, glico-bacterioclorinas e glico-isobacterioclorinas (Esquema 1.10).^{44,45}

Em 2008 grupo de Cavaleiro, utilizando o método referido, reporta a síntese de uma clorina hidrossolúvel (Esquema 1.11). Tal derivado tetrapirrólico caracteriza-se pela ligação de quatro unidades de ciclo-dextrina à *meso*-tetraquis(pentafluorofenil)clorina **1.21 (a)** com o anel pirrol reduzido fundido com um anel isoxazolidina.⁴⁶



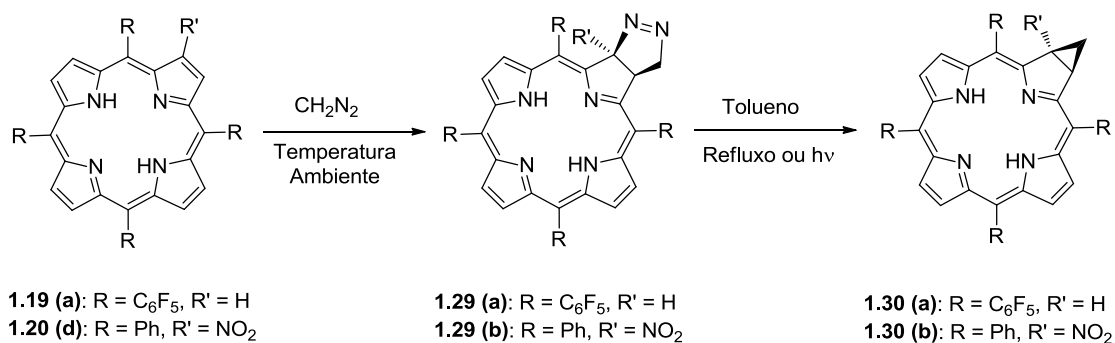
Esquema 1.10



Esquema 1.11

As reações de cicloadição 1,3-dipolar são efetivamente um método de síntese de anéis heterocíclicos de cinco membros,⁴⁷ pelo que estas reações têm sido aplicadas com sucesso em porfirinas *meso*-substituídas, apresentando maior seletividade quando são usadas porfirinas *meso*-tetra-arilsubstituídas com iletos de azometino e *N*-metilnitrona.⁴⁸

A reação de porfirinas com diazometano e subsequente extrusão de azoto originando clorinas fundidas com um anel de ciclopropano foi também reportada, sendo de salientar que a presença de um grupo nitro em posição β possibilitou a preparação de apenas uma clorina, prevenindo reações subsequentes (Esquema 1.12).⁴⁹



Esquema 1.12

Por fim, Li *et al.* publicaram um estudo pormenorizado de reações de porfirinas com óxidos de nitrilo, obtendo-se as respectivas clorinas.⁵⁰ Mais recentemente, foram reportadas as sínteses de clorinas tanto com óxidos de nitrilo aromáticos como alifáticos gerados *in situ*.⁵¹

1.7. Aplicações

Desde sempre que os macrociclos tetrapirrólicos, nomeadamente as porfirinas e clorinas, se revelaram compostos de características especiais. De entre tais características são de realçar as suas propriedades fotoquímicas, eletrónicas e catalíticas que lhes conferem grande potencialidade em diversas áreas da ciência, com principal destaque para aplicações na Terapia Fotodinâmica (PDT) e Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT).⁵² Salienta-se ainda que, segundo os tipos de inativação mencionados, estes macrociclos podem ser usados no diagnóstico e tratamento de doenças oncológicas e não oncológicas, na inativação ou eliminação de microrganismos, vírus e príões, em fluidos ou materiais contaminados, assim como em infeções.^{14,53-56}

As clorinas podem ser utilizadas para o tratamento de tumores fortemente pigmentados, devido ao facto de absorverem luz de comprimentos de onda bastante longos e, conseqüentemente, penetrando mais profundamente na zona da lesão. Estes macrociclos apresentar outras aplicações, tais como, biomarcadores devido à sua elevada capacidade de emitir fluorescência, catalisadores, assim como conversores de

energia solar em energia elétrica em células fotovoltaicas. As várias áreas de ação das clorinas dependem do tipo de grupos periféricos que estas apresentam – tanto nas posições *meso*, como nas β -pirrólicas.⁵⁷

1.7.1. Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (PDT) baseia-se em três conceitos: a acumulação preferencial do fotossensibilizador (PS) na célula anormal; a irradiação da célula, a um comprimento de onda adequado, que induz a ativação fotoquímica do oxigénio molecular ($^3\text{O}_2$) a espécies reativas de oxigénio (ROS), nomeadamente a oxigénio singuleto ($^1\text{O}_2$). Estas espécies reativas induzem stress oxidativo na célula, por reação com várias macromoléculas do conteúdo celular (de acordo com a localização subcelular do PS) provocando danos letais na célula que conduzem à sua destruição.⁵⁸

As primeiras experiências a usar o efeito fotodinâmico no tratamento de tumores em humanos foram feitas em 1903 por Tappenier e Jesionek, aplicando a eosina como fotossensibilizador (PS).⁵⁹ Embora os resultados tenham sido positivos, o aparecimento de outro tipo de tratamentos fez com que esta abordagem acabasse por não ter seguimento, como será explicitado no ponto 1.7.2.

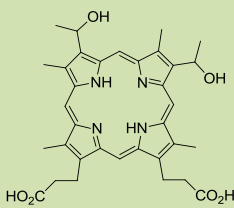
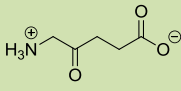
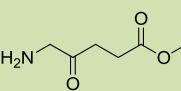
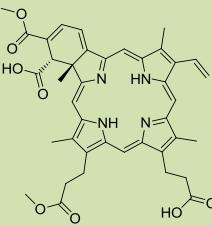
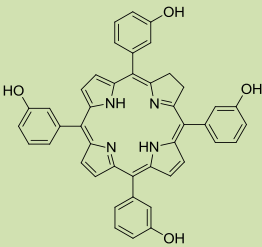
Várias décadas mais tarde depois de inúmeros estudos,^{35,60,61} um agente fototerapêutico denominado Photofrin[®], na Universidade de Búfalo, nos Estados Unidos da América (EUA), e comercializado pela QLT Photo-Therapeutics no final da década de 80, foi o primeiro agente fototerapêutico empregue em PDT a ser autorizado por órgãos governamentais (1993).⁶² A sua composição química exata não é ainda totalmente conhecida, sendo considerada uma mistura de porfirinas “di” e “oligoméricas” da hematoporfirina (1.31, Tabela 1.1).^{62,63}

A aplicação da PDT tem sido bastante difundida nos países mais desenvolvidos.^{62,64} Enquanto nestes países o uso da PDT já tinha sido autorizado há mais de 10 anos para o tratamento de diversos cancros, em Portugal é apenas aplicada, desde 2005, no Hospital da Universidade de Coimbra, no IPO de Coimbra (no tratamento de vários cancros urológicos, entre outros) e no Hospital de S. Marcos em Braga (no tratamento de lesões pré-oncológicas e oncológicas da pele do tipo não melanoma).^{64,65}

Os PSs de “1ª geração”, como o Photofrin[®], apesar de serem amplamente usados no tratamento das referidas condições patológicas, apresentam algumas características

menos favoráveis. De entre essas características, podemos desde logo destacar a prolongada fotossensibilidade cutânea, a baixa seletividade para com o tecido tumoral e a banda de absorção onde o fármaco é fotoactivado (região do vermelho) é fraca, zona do espectro eletromagnético ao qual os tecidos são mais transparentes.³⁵ Assim, têm sido desenvolvidos PSs de “2.ª” (clorinas e ftalocianinas, que apresentam uma intensa absorção na zona ideal de irradiação) e “3.ª geração” (PSs conjugados com anticorpos monoclonados, permitindo-lhes um vetor altamente específico), que tentam colmatar os inconvenientes dos de “1.ª geração”. A Tabela 1.1 apresenta PSs de “1.ª” e “2.ª geração” aprovados para o tratamento de doenças do foro oncológico e não oncológico.

Tabela 1.1- Fotossensibilizadores de “1.ª” e “2.ª geração” aprovados para tratamento de doenças oncológicas e não oncológicas.³⁵

Nome Comercial	Tipo de Macrociclo	Substância	Tratamento
Photofrin®	Porfirina	<p>oligómeros de</p>  <p>1.31: Hematoporfirina</p>	Cancro do pulmão, Cancro do esófago, em doentes de cuidados paliativos
Levulan®	Precursor da protoporfirina IX	 <p>1.32: ALA</p>	Cancro da próstata Acne e outras doenças de pele Condiloma vulvar e vaginal (HPV).
Metvix®	Precursor da protoporfirina IX	 <p>1.33: M-ALA</p>	Diversas lesões pré-cancerígenas e cancerígenas da pele
Visudyne®	Clorina	 <p>1.34: Verteporfin</p>	Degeneração macular da retina
Foscan®	Clorina	 <p>1.10: Temoporfin</p>	Cancro Cabeça-pescoço.

Embora a PDT tenha sido originalmente desenvolvida visando o tratamento do cancro, têm vindo a ser verificadas as suas elevadas potencialidades em outros tipos de tratamentos, nomeadamente na psoríase, na degeneração macular da retina, condições autoimunes, arteriosclerose, remoção de verrugas na laringe, tratamento de micoses fungóides e destruição de infeções bacterianas resistentes a tratamentos à base de antibióticos.^{62,66-68}

1.7.2. Terapia fotodinâmica antimicrobiana

A inativação de microrganismos, por ação da luz, surgiu anos antes de von Tappenier e Jesionek apresentarem a sua teoria sobre o efeito fotodinâmico – *i.e.*, efeito dependente de três factores indispensáveis: espécie fotossensibilizadora, fonte de luz e oxigénio molecular. O cientista alemão Raab publicou o primeiro estudo sobre o efeito fotodinâmico de alaranjado de acridina (**1.35**, Figura 1.8) contra *Paramecium caudatum*.⁶⁹ Contudo, a descoberta quase acidental da penicilina⁷⁰ (**1.36**, Figura 1.8) em 1928, a qual foi encarada como um marco da medicina moderna, acabou por espoletar a procura de muitos outros compostos de atividade semelhante e consequente esquecimento da aPDT.⁷¹

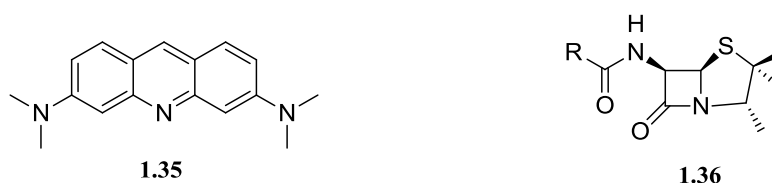


Figura 1.8 – Estrutura do PS alaranjado de acridina **1.35** e do antibiótico penicilina **1.36**.

Assim, a penicilina e todos os outros antibióticos entretanto descobertos têm auxiliado milhares de pessoas no tratamento de doenças microbianas infecciosas, potencialmente mortíferas. Esta circunstância contribuiu para o aumento em cerca de dez anos a esperança média de vida humana. Não obstante, tais avanços científicos têm sido acompanhados por uma diminuição da eficácia dos antibióticos presentes no mercado, fruto do seu uso generalizado, muitas vezes inapropriado e por vezes excessivo.⁷² Esta diminuição de eficácia deve-se ao desenvolvimento de mecanismos de resistência a estes fármacos – *e.g.*, o espessamento da sua parede exterior e a codificação de novas proteínas que impedem a penetração das drogas – por parte dos organismos patogénicos a cujo combate se dirigiam.⁷²

De facto, durante as últimas décadas tem surgido um crescente número de bactérias resistentes aos antibióticos comuns. Na década de 60, a *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (**1.37**, Figura 1.9) (MRSA) adquire resistência contra todos os antibióticos β -lactâmicos. Anos mais tarde, dois outros casos de bactérias – *enterococci* e *S. aureus* – mostram ser resistentes face a um antibiótico glicopeptídico, nomeadamente à vancomicina (**1.38**, Figura 1.9) que, se apresentara até então, como antibiótico de último recurso.

O descrito tornou-se um problema de especial importância, principalmente em ambientes tidos como de risco (*e.g.*, hospitais), onde os antibióticos são de uso corrente e onde as estirpes bacterianas podem facilmente desenvolver resistência aos vários grupos de antibióticos aí utilizados.⁷³⁷⁵

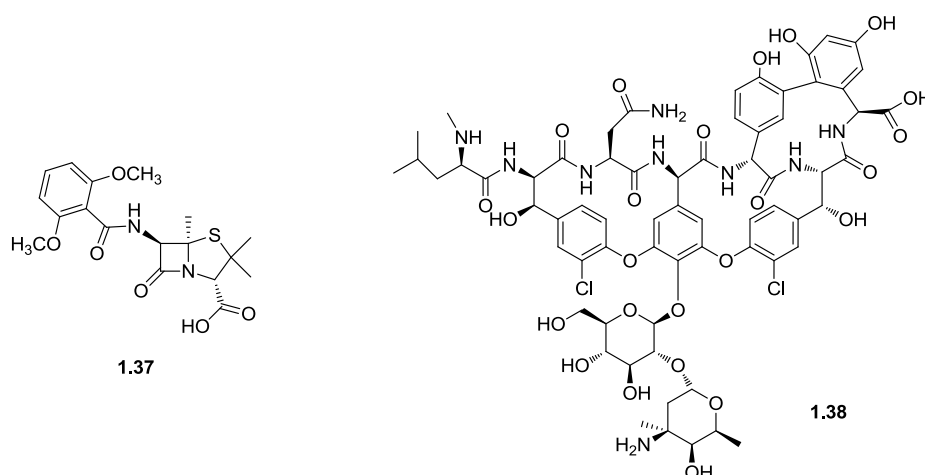


Figura 1.9 – Estrutura dos antibióticos meticilina **1.37** e vancomicina **1.38**.

Tal problemática impôs que se tenha erigido em imperativo de curto prazo a identificação e desenvolvimento de novos agentes e métodos capazes de suprir as limitações dos antibióticos. Assim, é neste contexto que se retomam os estudos baseados na aPDT, como um método alternativo promissor e eficaz na fotoinativação de microrganismos.⁵⁸

1.7.2.1. Porfirinas como agentes antimicrobianos

Nos últimos anos, muitos estudos têm vindo a ser realizados para a fotoinativação destes microrganismos patogénicos tanto a nível clínico (o campo mais explorado), como a nível ambiental, usando porfirinas, e seus análogos, como agentes fotossensibilizadores em aPDT.

Os derivados porfirínicos usados como PSs na fotoinativação de microrganismos podem ser divididos em dois grupos. O primeiro grupo inclui os macrociclos de origem natural, assim como os seus derivados modificados; por seu turno, do segundo grupo fazem parte os derivados tetrapirrólicos sintéticos, que podem apresentar-se na forma neutra, catiónica ou aniónica. De facto, este tipo de macrociclos, tanto de origem natural ou sintética, já se revelou em vários estudos eficaz na fotoinativação de bactérias, vírus, fungos e protozoários.^{54,76-80} Podemos ainda acrescentar que, de entre este tipo de derivados são as porfirinas *meso*-tetra-arilssubstituídas o tipo de PS de eleição usado na inativação destes organismos patogénicos.⁸¹

1.7.2.1.1. Área clínica

Embora vários estudos, nomeadamente sobre a distribuição do PS, fontes de luz e equipamentos endoscópicos, anteriormente realizados na PDT possam ser estendidos para a aPDT, outros aspetos não o poderão ser.

Contrariamente ao que sucede na PDT para tratamento de cancro, onde o PS é geralmente injetado na corrente sanguínea, na aPDT para infeções localizadas, na maioria dos casos a administração do PS é realizada localmente. Tal processo pode ser levado a cabo por aplicação tópica, instilação, injeção intersticial ou aerossol.⁸¹

Embora vários agentes PSs tenham sido já aprovados clinicamente para o tratamento do cancro (Tabela 1.1), no que concerne à fotoinativação de microrganismos apenas os PSs derivados do ALA (**1.32**: ácido *delta*-aminolevulínico, Tabela 1.1) são de uso corrente em testes *in vivo* (Tabela 1.2). Um exemplo da utilização do ALA diz respeito ao tratamento de infeções bacterianas, ao nível da pele, por *Propionibacterium acnes*, infeções virais provocadas pelo vírus do papiloma humano (HPV) ou leishmaniose cutânea.⁸² Na realidade, uma das potenciais aplicações dos derivados porfirínicos, a nível clínico, é a esterilização de sangue e seus componentes e o tratamento de infeções da cavidade oral.⁸³

Tabela 1.2 – Resumo dos microrganismos fotoinactivados pelo ALA.⁸¹

Microrganismo Inativado	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Onychomycosis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Staphylococci</i>
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> e MRSA
Vírus do Herpes simplex	<i>Streptococcus epidermis</i>
Vírus da imunodeficiência humana	<i>Streptococcus faecalis</i>

A aplicação clínica da aPDT, envolvendo estes macrociclos, deve ter em atenção alguns aspetos, tais como:^{56,81}

1. o PS deve destruir de forma efetiva os agentes patogénicos responsáveis pela condição de doença do utente;
2. o PS deve ser seletivo para os microrganismos, evitando assim um grau elevado de danos no tecido junto à área infetada;
3. a reincidência do crescimento de organismos patogénicos deve ser evitada;
4. a eficácia dos referidos derivados tetrapirrólicos usados em aPDT, em tratamentos clínicos de microrganismos de estirpes multirresistentes deve ser semelhante à conseguida para estirpes sensíveis;
5. para uma melhor avaliação do potencial do PS porfirínico, os seus resultados deverão ser comparados com os obtidos com outros PSs já usados em aPDT clínica.

1.7.2.1.2. Área ambiental

A inativação de microrganismos recorrendo ao efeito fotodinâmico não se tem restringido à área clínica. Embora poucos estudos tenham ainda sido realizados, a área ambiental tem apresentado resultados preliminares animadores tanto a nível laboratorial como em estações de tratamento piloto.⁸¹ Nestas áreas, os derivados porfirínicos têm apresentado um enorme potencial para aplicação ambiental, nomeadamente na desinfecção de águas em estações de tratamento, assim como em pisciculturas.⁸¹ Vários

têm sido os estudos que reportam resultados promissores no tratamento de águas residuais, usando porfirinas como PSs.⁸⁴⁻⁸⁷

Segundo Alves *et al.* porfirinas tri- e tetra-catiónicas, quando irradiadas com luz apropriada, inativam de forma eficaz bactérias fecais Gram-positivas [Gram (+)] – *e.g.* *Enterococcus faecalis* – e Gram-negativas [Gram (-)] – *e.g.* *Escherichia coli*.⁸⁶

Tal como na área clínica, existem algumas premissas que devem ser avaliadas para que seja viável a utilização desta técnica a nível ambiental, tais como:

1. possibilidade de remoção do PS após o tratamento por aPDT, com o intuito de o recuperar e reutilizar, evitando também a sua libertação para o meio ambiente;
2. estabilidade no meio a tratar e às condições de irradiação;
3. toxicidade do PS para os organismos aquáticos, tendo em atenção o impacto desta inativação nos microrganismos naturais não patogénicos.^{58,88}

1.7.2.2. Clorinas como agentes antimicrobianos

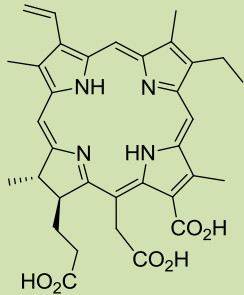
Atualmente estão em curso imensos estudos para sintetizar novos fotossensibilizadores (PSs) com melhores propriedades fotofísicas (absorção de radiação a maiores comprimentos de onda, possibilitando uma maior penetração da luz, daí resultando um maior efeito terapêutico) e químicas (estruturas moleculares bem definidas). De entre estes PSs, salientam-se os esforços no desenvolvimento dos chamados PSs de “2.^a e 3.^a geração”, que incluem porfirinas modificadas, clorinas, que exibem uma banda de absorção intensa a 660-690 nm, bacterioclorinas que apresentam uma intensa banda de absorção 730 nm e ftalocianinas.^{56,39}

Quanto às clorinas, derivados porfirínicos que apresentam uma unidade pirrólica reduzida, a maioria dos estudos reportados sobre elas como agente PS dizem respeito à PDT de doenças oncológicas e não oncológicas.^{89,90,44(c),46} Os macrociclos tetrapirrólicos do tipo clorina também podem ser usados na inativação de microrganismos maioritariamente, a nível clínico.⁹¹⁻⁹⁵

A clorina e₆ (**1.39**, Tabela 1.3), de origem natural, (aprovada já para tratamento do cancro) tem sido usada tanto na sua forma pura como derivatizada para a inativação de bactérias.⁸¹ Jong-Hwan Park *et al.* testaram a clorina e₆ ultra pura na inativação de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Escherichia coli* (*E. coli*), e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Os resultados revelaram que este PS (numa concentração de 10 µM) é um agente alternativo e

promissor no tratamento antimicrobiano.⁹⁵ Liyi Huang *et al.* reportaram também que, conjugados da clorina e₆ com polímeros de polietilenimina são eficazes no tratamento local de infecções provocadas tanto por bactérias *E. coli* como *S. aureus* e *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*).⁹² Um outro derivado tetrapirrólico do tipo clorina é a *m*-THPC (**1.10**, Tabela 1.1) que, conjugado com lipossomas, mostrou inativar eficazmente a bactéria *E. faecalis* persistente em infecções endodônticas.⁹⁴

Tabela 1.3 - Resumo dos microrganismos já fotoinactivados pela clorina e₆.⁸¹

Estrutura	Microrganismo Inativado
 <p>1.39: Clorina e₆</p>	<p><i>Bacillus subtilis</i></p> <p><i>Capnocytophaga gingivalis</i></p> <p><i>Escherichia coli</i></p> <p><i>Fusobacterium nucleatum</i></p> <p><i>Mycobacterium smegmatis</i></p> <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p><i>Propionibacterium gingivalis</i></p> <p><i>Actinobacillus</i></p> <p><i>Actinomycetemcomitans</i></p> <p><i>Actinomyces viscosus</i></p> <p><i>Bacteroides forsythus</i></p> <p><i>Campylobacter rectus</i></p> <p><i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i></p> <p><i>Porphyromonas gingivalis</i></p> <p><i>Streptococcus sobrinus</i></p> <p><i>Streptococcus mitis</i></p> <p><i>Streptococcus oralis</i></p> <p><i>Streptococcus mutans</i></p> <p><i>Staphylococcus aureus</i></p> <p><i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)</p> <p><i>Streptococcus pyogenes</i></p>

Como explicitado em **1.7.1.** as clorinas são consideradas PSs de “2.^a geração”, que embora já reúnam um conjunto substancial de estudos na área clínica, muitas premissas terão ainda de ser confirmadas na área da fotoinativação de microrganismos e esforços realizados tanto a nível científico como governamental.

1.7.2.3. Fotoinativação de células bacterianas

No que respeita à eficiência da inativação bacteriana, vários estudos efetuados nesta área mostram uma diferente sensibilidade à fotoinativação, por parte das bactérias Gram (+) e bactérias Gram (-). As Gram (-) apresentam menor sensibilidade à aPDT do que as Gram (+) pois possuem menor permeabilidade membranar.⁹⁶ Este facto torna necessário o auxílio de substâncias que aumentem a permeabilidade da sua membrana exterior, permitindo a passagem do PS para o interior da célula ou uma maior ligação à membrana celular.^{97,98} As representações esquemáticas, apresentadas na Figura 1.10 e a sua curta explicação permitirão compreender no que diferem os dois tipos de células bacterianas.

Essa resistência tendo vindo a ser superada através da administração conjunta do PS com um agente desorganizador da membrana não citotóxico (como o PMNP – Polymyxin B nonapeptide) ou então usando PSs catiónicos que interagem com componentes da membrana externa, desorganizando-a e aumentando a sua permeabilidade, ao passo que, com PS neutros ou aniônicos, estas últimas mantêm-se fotorresistentes.^{36,56,99}

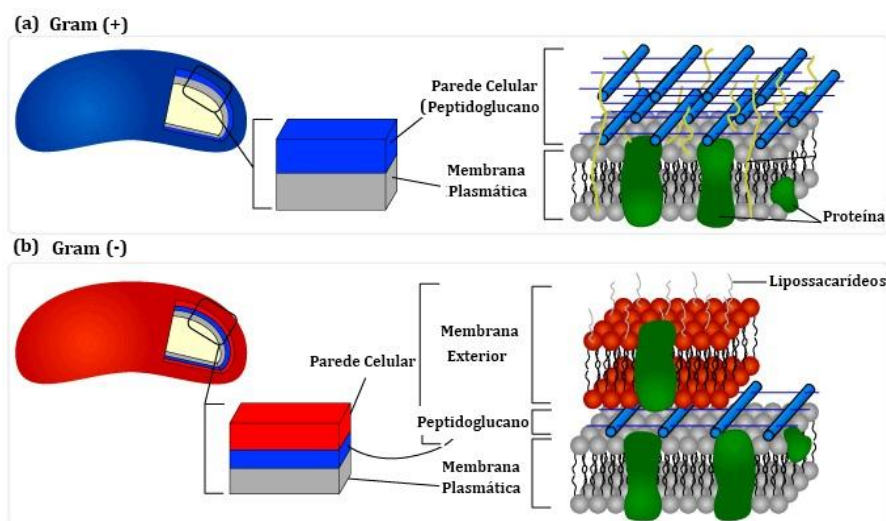
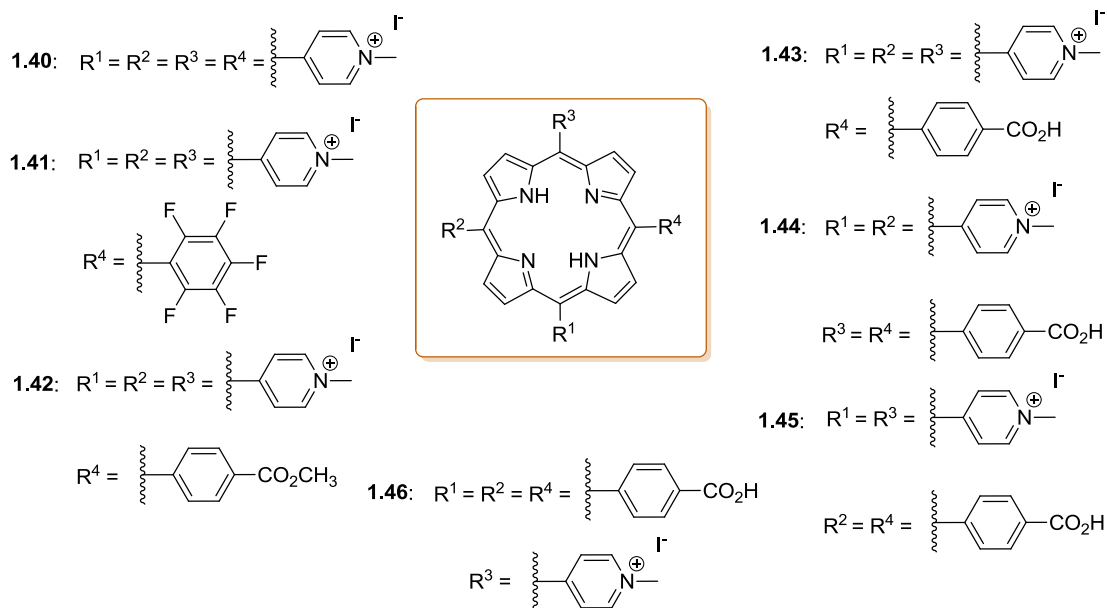


Figura 1.10 – Representação esquemática da estrutura da parede celular de uma bactéria Gram (+) (a) e de uma bactéria Gram (-) (b).¹⁰⁰

Como é possível observar, as diferenças entre estes dois tipos de bactérias residem, essencialmente, na composição estrutural das suas paredes celulares. As bactérias Gram (+) apresentam uma parede espessa e homogênea predominantemente constituída por peptidoglicano, ao passo que as bactérias Gram (-) possuem uma parede constituída por uma membrana externa e por uma camada interna onde se localiza o peptidoglicano. No entanto, é a membrana externa que distingue as bactérias Gram (-) das Gram (+). Embora represente uma barreira à passagem de substâncias de elevado peso molecular, tais como proteínas, para o interior e exterior da célula, é permeável a moléculas de menores dimensões como péptidos e polissacarídeos. Esta permeabilidade seletiva pertence também à carga elétrica dos compostos que a tentam penetrar.⁹⁶

Alguns grupos de investigação tentaram comparar a eficiência das porfirinas sintéticas catiónicas com a diferente distribuição das cargas na molécula, não sendo, contudo, consensuais os resultados obtidos. Alves *et al.* testaram um conjunto de derivados porfirínicos mono-, di-, tri- e tetra-catiónicos (1.40-1.46, Esquema 1.13) – contra *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* demonstrando que existem factores que

aumentam o caráter anfifílico das porfirinas. Dentro destes factores pode-se distinguir a assimetria na distribuição das cargas dos grupos periféricos, as cargas positivas combinadas de modos diferentes com diferentes grupos lipofílicos, a introdução de grupos aromáticos e a modelação do número de cargas do PS. Este aumento do caráter anfifílico do PS permite-lhe apresentar maior afinidade pela bactéria, auxiliando-o na sua acumulação nas células e consequente aumento da fototoxicidade.⁸⁶



Esquema 1.13

1.7.2.3.1. Bactérias multirresistentes

Determinadas estirpes bacterianas, como microrganismos capazes de desenvolver resistência a antibióticos, são designadas por bactérias multirresistentes se o crescimento delas não for cessado/inibido por, pelo menos, três famílias diferentes de antibióticos.¹⁰¹ A este tipo de resistência é atribuída a designação de resistência adquirida, podendo esta ocorrer por diferentes causas, nomeadamente, por (i) mutações genéticas (nos cromossomas), levando à resistência cruzada, (ii) transferência de genes de um microrganismo para outros por plasmídeos (conjugação ou transformação), por transposições (conjugação), integrões e bacteriófagos (transdução).¹⁰²

Após a obtenção de genes portadores de informação que lhes permita protegerem-se de vários agentes antimicrobianos, as bactérias podem usar quatro mecanismos bioquímicos de resistência:¹⁰² (i) fenómeno de efluxo (existência de um canal proteico que bombeia ativamente o antibiótico para o exterior da célula antes que

ele atinja o alvo); (ii) modificação do alvo (ocorre inibição da síntese de proteínas ou novos transportadores membranares, que impedem a ligação do antibiótico, tornando-o inativo); (iii) inibição de vias metabólicas (inibição da enzima associada ao metabolismo do fármaco) e; (iv) diminuição da permeabilidade da membrana citoplasmática (bloqueio das porinas, por alteração do tamanho destas – ocorre normalmente nas bactérias gram-negativas – ou mutação dos canais de transporte ativo da membrana citoplasmática).

No que concerne à inativação de microrganismos através da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), usando derivados tetrapirrólicos, estudos recentes comparavam o não surgimento de resistência a esta inativação.^{58,84} Salientando-se ainda, a existência de vários estudos que revelam a aPDT como processo eficaz na fotoinativação de microrganismos multirresistentes.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Nakonieczna *et al.* reportam a fotoinativação de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) multirresistente (MRSA), usando a protoporfirina-IX, como fotossensibilizador (PS).¹⁰⁴ Schastak *et al.* reporta também a inativação de estirpes multirresistentes de *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Escherichia coli* com derivados porfirínicos tetra-catiônicos meso-tetra-substituídos.¹⁰⁵

1.7.2.4. O fotossensibilizador

O PS é talvez o componente mais importante na aplicação desta inativação. Vários factores têm que ser tidos em conta quando se tenta desenvolver um novo PS, nomeadamente, a forma de administração, a localização, o comprimento de onda da radiação a que o composto tem um máximo de absorção, as propriedades fotofísicas do composto, a pureza, a farmacocinética, o metabolismo, os efeitos secundários e a toxicidade.⁵⁵ Só apenas quando forem encontradas todas estas características num só composto se poderá concluir estar em presença do PS ideal. Assim, o PS, para além das características reportadas por Alves *et al.*, apresentadas em 1.7.2.3. deverá reunir várias outras características para ser considerado um bom PS, nomeadamente:¹⁰⁶

1. ser quimicamente puro;
2. produzir oxigénio singuleto ou outras espécies reativas de oxigénio;
3. acumular-se de modo estratégico no microrganismo a inativar;
4. usar fontes de ativação de baixo custo;
5. apresentar uma rápida excreção;
6. não ser mutagénico;

7. não apresentar toxicidade não ausência de luz;
8. inativar bactérias, vírus, fungos, leveduras e protozoários;
9. possuir um largo espectro de ação
10. apresentar um mecanismo de inativação que torne mínimo o risco de desenvolvimento de estirpes resistentes ao processo.

Em complemento ao já exposto acima, dever-se-á realçar também não ser só a distribuição dos grupos periféricos que se mostra importante mas também o tamanho. Reddi *et al.*, através da realização de estudos fotofísicos usando porfirinas *meso*-substituídas com cadeias de hidrocarbonetos de seis a vinte e dois carbonos, conclui que a eficiência do PS é diretamente proporcional ao tamanho da cadeia carbonada que faz parte dos grupos periféricos, parecendo haver, contudo, uma certa tendência para fenômenos de agregação em especial nos derivados de vinte e dois carbonos.¹⁰⁷ Os estudos realizados por Gomes e seus colegas demonstram, para porfirinas *meso*-tetra-substituídas, com derivados de cadeias *N*-aquilo (C1, C5, e C12) com comprimentos diferentes, que o derivado *N*-dodecilo apresenta uma diminuição drástica de solubilidade, devido possivelmente a fenômenos de agregação, resultando na consequente redução da eficiência do efeito fotodinâmico.⁸⁰

Por último, mas de menor importância, é a influência da concentração do PS usado. Vários estudos reportam que o aumento da concentração de PS, regra geral aumenta a velocidade de inativação. Contudo, essa concentração não deverá atingir valores que provoquem a saturação de PS, pois a partir desse valor o processo de inativação não apresentará maior taxa de inativação.⁸¹

1.7.2.5. A luz

A fonte de luz é também crucial nesta inativação pois é ela que desencadeia todo o processo de fotoinativação. Esta poderá ser usada tanto na forma de laser, sob a forma de uma simples lâmpada de filamento de tungstênio ou mesmo luz solar.⁸¹

O comprimento de onda necessário para que ocorra fotoinativação depende não só do microrganismo como também da estrutura e do espectro de absorção eletrônico do mesmo. Assim, a luz usada deverá apresentar um comprimento de onda na zona de maior absorção do PS usado – *e.g.* para as porfirinas a região dos 390 – 425 nm e para as clorinas na região dos 390 – 430 nm e 660 – 690 nm, pelas razões explicitadas em

1.3.

Tendo presente o espectro eletromagnético (Figura 1.11), no que respeita à luz branca (constituída por todos os comprimentos de onda da região do visível), estudos revelam que o aumento do comprimento de onda da fonte luminosa induz o decréscimo da eficácia do processo fotodinâmico, para derivados do tipo porfirina.⁸¹ Isto indica que a luz azul se mostra mais eficiente que a luz vermelha e a verde. Apesar de a luz azul se mostrar mais eficaz (nas situações em análise), a luz vermelha acaba por ser a mais indicada para tratamento de lesões profundas, visto ser uma radiação mais penetrante.⁸¹

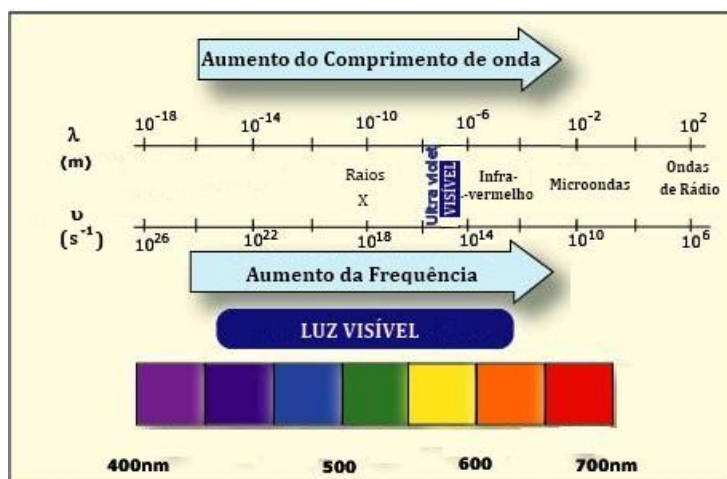


Figura 1.11 – Representação do espectro eletromagnético.¹⁰⁸

1.7.3. Mecanismos associados ao efeito fotodinâmico

O mecanismo de fotossensibilização foi sendo estabelecido ao longo do século XX, sendo o seu conhecimento responsável pelo grande desenvolvimento da PDT e aPDT.⁵⁶ Nos anos 30 foi conhecida a dependência da presença de oxigénio e da acumulação do PS para obter o efeito fotodinâmico. Mais recentemente foi sugerido que o resultado da aPDT se deve a vários processos fotoquímicos e biológicos, sendo este o conceito que ainda prevalece para explicar o efeito fotodinâmico.⁵⁵ O processo de fotossensibilização encontra-se ilustrado no diagrama de Jablonski (Figura 1.12).

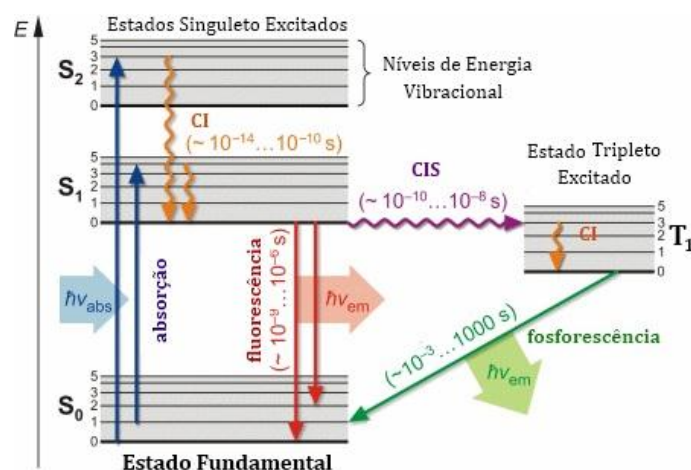


Figura 1.12 – Diagrama de Jablonski modificado.¹⁰⁹

Se o máximo de absorção da porfirina for igual ao comprimento de onda da radiação incidente, ocorrerá excitação da porfirina de um estado fundamental singuleto (S_0) para um estado excitado singuleto (S_1) cujo tempo de vida é da ordem dos nanossegundos. Em princípio, o eletrão poderia passar a outros estados excitados singuleto, com tempos de vida na ordem dos picossegundos. No entanto, processos de conversão interna conduzem a porfirina ao estado excitado de singuleto menos energético (S_1). Após alguns nanossegundos, a espécie S_1 volta ao estado fundamental.⁷⁹ Neste estado excitado, o eletrão do PS pode seguir cinco vias de decaimento, sendo uma delas a mais preponderante no efeito fotodinâmico. Essa via envolve a passagem do PS do estado de singuleto para o estado de tripleto (T_1), requerendo a inversão de *spin*.

Quando o PS está no estado tripleto podem ocorrer danos celulares irreversíveis, através de dois mecanismos. Esses dois processos são referidos como processos do tipo I e do tipo II, sendo o mecanismo de tipo II predominante em relação ao de tipo I, e encontra-se melhor documentado na literatura.

Mecanismo tipo I – O fotossensibilizador (PS) que se encontra no estado excitado tripleto reage diretamente com as moléculas que lhe estão próximas por processos de transferência de eletrões formando espécies radicalares, espécies reativas de oxigénio (ROS). No caso em que o oxigénio é o substrato forma-se O_2^- (anião superóxido) que se converte em radicais do tipo $OH\cdot$ que podem reagir posteriormente com o oxigénio ou outras moléculas (como os lípidos ou proteínas), originando um processo em cadeia.

Mecanismo tipo II – O PS no estado excitado tripleto transfere energia para moléculas no estado fundamental. Para se verificar a regra da conservação de *spin* e

para que haja interação entre o PS e o substrato ambos têm que se encontrar num estado tripleto, sendo necessário que a energia do estado tripleto do substrato seja menor que a do PS.

Os substratos biológicos apresentam uma energia de estado tripleto relativamente mais alta à dos PSs, como as porfirinas. Ao contrário do oxigénio, que no seu estado fundamental está no estado tripleto ($^3\text{O}_2$). A energia proveniente do PS pode ser transferida para $^3\text{O}_2$ que passa ao estado de singuleto ($^1\text{O}_2$), espécie bastante reativa e citóxica.¹¹⁰ A formação de $^1\text{O}_2$ está, portanto, diretamente relacionada com a morte celular. A eficiência do processo de fotoinativação está dependente da presença de oxigénio molecular, sendo a eficiência com que um PS transfere energia do seu estado tripleto para o $^3\text{O}_2$ gerando $^1\text{O}_2$ – uma das principais características de um bom PS.¹¹⁰ Os principais danos resultantes da atividade fotodinâmica ocorrem ao nível da membrana citoplasmática. Tais danos podem envolver perda/saída dos constituintes celulares ou a inativação dos sistemas de transporte e enzimas membranares.^{58,81}

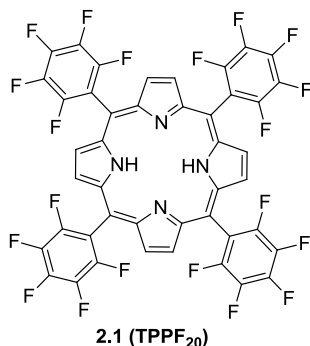
Capítulo II

Síntese de porfirinas e clorinas *meso*-tetra-substituídas

2.1. Introdução

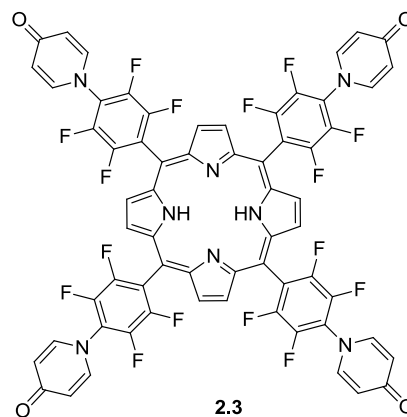
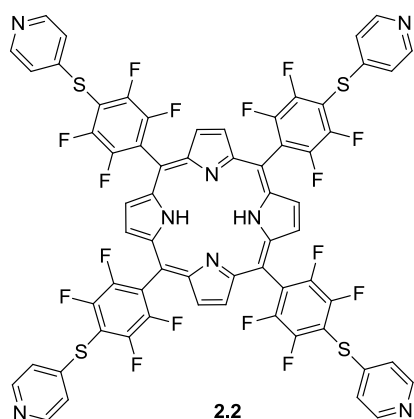
Desde há várias décadas que muitos são os grupos de investigação que têm explorado a síntese de porfirinas. A tentativa de criação de novos derivados, assim como novas técnicas de obtenção destes macrociclos tem emergido, tendo em vista as suas variadíssimas áreas de aplicação. Como referido no capítulo anterior as porfirinas têm-se demonstrado como sendo agentes fotossensibilizadores (PS) promissores no tratamento do cancro, da degeneração macular da retina e na eliminação de microrganismos (bactérias, vírus, fungos e protozoários).⁷⁶⁻¹¹¹

Assim, numa primeira parte deste trabalho serão descritos os métodos de síntese utilizados na preparação de porfirinas *meso*-tetra-substituídas catiónicas, usando a *meso*-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina **2.1**, doravante TPPF₂₀, como precursora.



A primeira síntese da TPPF₂₀ data de 1969, através da condensação de pirrol com pentafluorobenzaldeído numa proporção de 1:1, sob aquecimento clássico. Hoje em dia, este macrociclo é comercial, no entanto, neste trabalho foi realizada a sua síntese devido a questões não só económicas, como didáticas.¹¹² A síntese deste precursor foi levada a cabo segundo um dos métodos já apresentados no capítulo anterior, no qual se recorre também à condensação de pirrol com pentafluorobenzaldeído, usando como solvente uma mistura de ácido acético ou propiónico e nitrobenzeno, a 120 °C, durante uma hora.³³

A escolha deste macrociclo tetrapirrólico para a síntese dos derivados pretendidos prende-se com o facto de este poder ser eficientemente derivatizado por substituição nucleofílica dos átomos de flúor. Assim, fez-se reagir a TPPF₂₀ com a 4-mercaptopiridina e 4-hidroxipiridina, separadamente, originando respetivamente os derivados **2.2** e **2.3**.



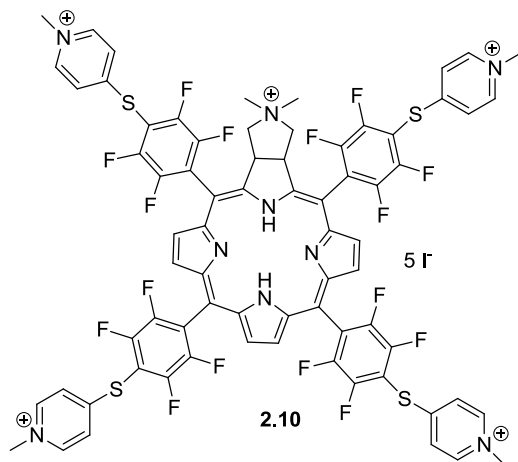
Tendo em conta que um dos objetivos deste trabalho é avaliar a capacidade de derivados porfirínicos na fotoinativação de bactérias, os compostos foram cationizados, dando origem a potenciais fotossensibilizadores tetracatiônicos de “1.^a geração”.

Um outro derivado tetrapirrólico já abordado no capítulo anterior, é o derivado do tipo clorina. Tal como as porfirinas, as clorinas também apresentam diversas aplicações em diferentes áreas científicas, nomeadamente em medicina, onde têm vindo a ser usadas como biomarcadores, fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica no tratamento de doenças oncológicas, entre outras. O núcleo das clorinas difere do das porfirinas devido a apresentarem uma das unidades pirrólicas reduzidas, o que lhes confere a capacidade de absorver mais fortemente na região do vermelho do espectro eletromagnético, do que as porfirinas.⁹¹⁻⁹⁴

Como foi apresentado no capítulo I desta dissertação, muitos são os protocolos que poderão levar à síntese de derivados deste tipo. A ferramenta mais útil e explorada, nos últimos anos, para a obtenção deste tipo de compostos consiste na modificação química do núcleo porfirínico, *via* reações de cicloadição. Em particular, o comportamento como dipolarófilo do macrociclo porfirínico tem sido bem documentado, demonstrando que as porfirinas podem participar em reações de cicloadição 1,3-dipolar com uma grande variedade de dipólos tais como, íletos de azometino, nitronas, diazoalcanos ou mesmo óxidos de nitrilo e íletos de carbonilo. A abordagem das reações de cicloadição tem também demonstrado que os macrociclos do tipo porfirina podem atuar como dienófilos em reações de Diels-Alder originando derivados com uma unidade pirrólica reduzida, com bons rendimentos.^{104,111}

Deste modo, neste capítulo será também descrita a metodologia adotada para a síntese de uma clorina catiónica funcionalizada nas posições *meso* com grupos mercaptopiridínio, a clorina **2.10**, partindo de uma porfirina *meso*-tetra-substituída, a

TPPF₂₀, *via* reação 1,3-dipolar. Tal derivado foi construído visando a sua posterior utilização como fotossensibilizador de “2.^a geração”, na inativação de microrganismos.

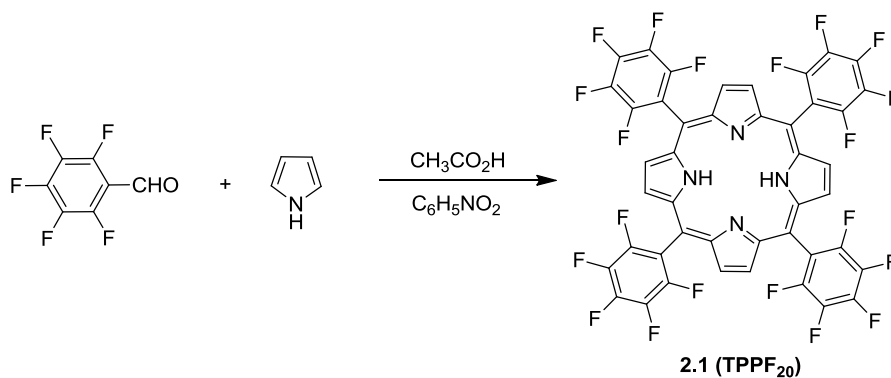


Neste mesmo capítulo serão também apresentados alguns estudos realizados com *orto*-quinonas metídeo (álcool 2-hidroxibenzílico, a 4-hidroxycumarina e também a 2-hidroxi-1,4-naftoquinona) que, segundo estudos de Ferreira *et al*, são capazes de gerar *in situ* dienos.¹¹³ Dos referidos estudos não foi possível a obtenção de qualquer produto, da sua reação com a TPPF₂₀, suscetível de ser caracterizado estruturalmente e, assim como avaliado biologicamente.

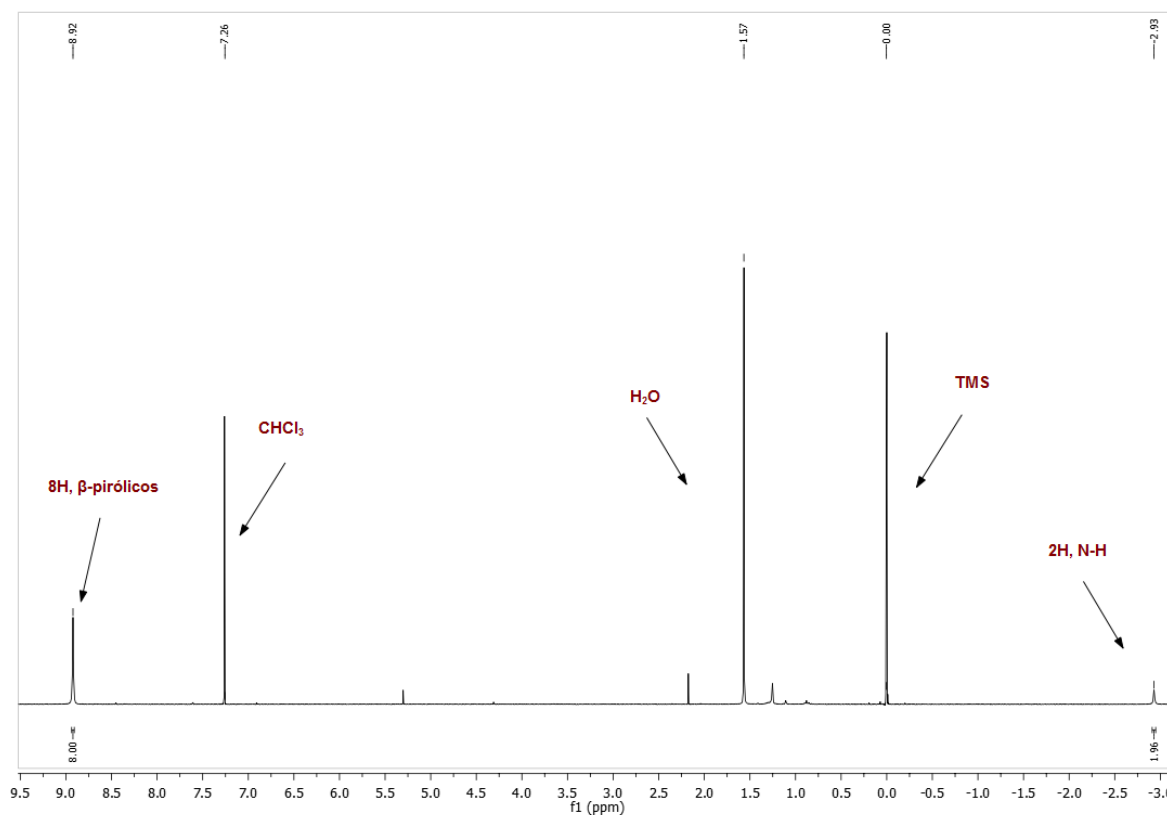
2.2. Síntese de porfirinas *meso*-tetra-substituídas

2.2.1. Síntese da *meso*-tetraakis(pentafluorofenil)porfirina

Apesar da porfirina de partida, a TPPF₂₀, estar disponível no mercado, por motivos de aprendizagem e de custo, foi necessário sintetizá-la. A metodologia utilizada para esta síntese encontra-se já reportada por Gonsalves *et al*.³³ Esta porfirina possui quatro grupos pentafluorofenilo nas posições *meso*, e foi preparada por condensação de pirrol com pentafluorobenzaldeído, numa proporção 1:1, usando uma mistura de ácido acético glacial/nitrobenzeno a refluxo (Esquema 2.1). Ao fim de cerca de uma hora considerou-se a reação terminada, procedendo-se de seguida à destilação, a pressão reduzida, da mistura dos solventes até à secura. O resíduo foi sujeito a cromatografia rápida em coluna de sílica, usando diclorometano/éter de petróleo (1:1) como eluente, tendo-se obtido uma primeira fração, com um rendimento de 13%, que foi identificada como sendo a porfirina **2.1**. Recolheu-se ainda uma segunda fração, de coloração azulada – hexafirinas – para estudos futuros.


Esquema 2.1

O composto **2.1** foi comparado por TLC com a TPPF₂₀ de referência e caracterizado por espectroscopia de RMN de ¹H e ¹⁹F. Quanto ao espectro de RMN ¹H, observa-se um singuleto a δ 8.93 ppm, correspondente à ressonância dos oito prótons β-pirrólicos, pois estes prótons encontram-se muito desprotegidos devido à elevada corrente de anel provocada pelos elétrons π. O sinal correspondente à ressonância dos prótons internos do macrociclo porfirínico (N-H) surge, na forma de um singuleto, a δ - 2.92 ppm, à direita do sinal correspondente à ressonância dos prótons do TMS (Figura 2.1).


Figura 2.1 –Espectro de RMN de ¹H da TPPF₂₀, em CDCl₃.

O espectro de RMN de ^{19}F apresenta, como seria de esperar, três sinais diferentes correspondentes à ressonâncias dos *orto*, *meta* e *para* flúores. Os átomos *meta* flúores são os mais protegidos, uma vez que esta posição é, preferencialmente, protegida. Deste modo, estes átomos aparecem no espectro a δ -184,83 ppm, na forma de um duplo duplete de dupletos, devido ao acoplamento quer com o *meta* flúor do outro lado do anel, quer com os átomos de flúor nas posições adjacentes, *orto* flúores e *para* flúores. O sinal correspondente à ressonância dos *para* flúores aparece na forma de um triplete resultante do acoplamento destes com os flúores da posição vizinha, a *meta*, a δ -174,64 ppm. Por último, o sinal corresponde aos *orto* flúores, os menos protegidos dos três conjuntos referidos, a δ -160,04 ppm, surge na forma de um duplo duplete, devido ao acoplamento com o *orto* flúor do outro lado do anel e com o *meta* flúor (Figura 2.2).

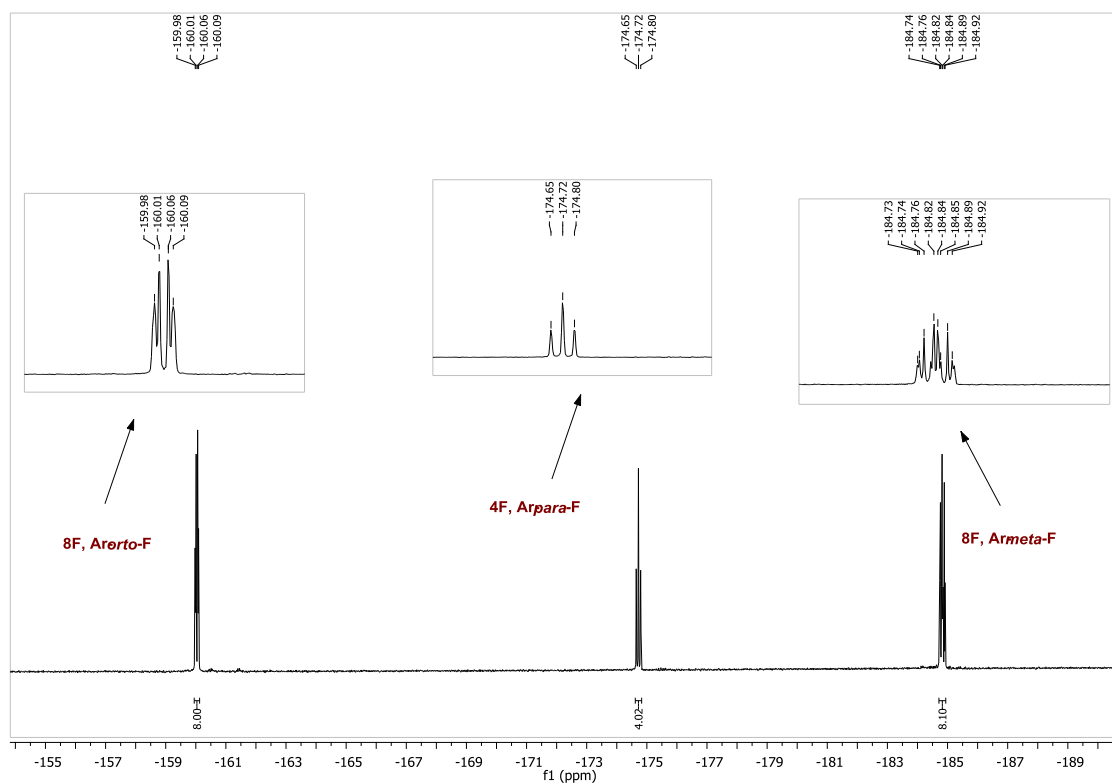
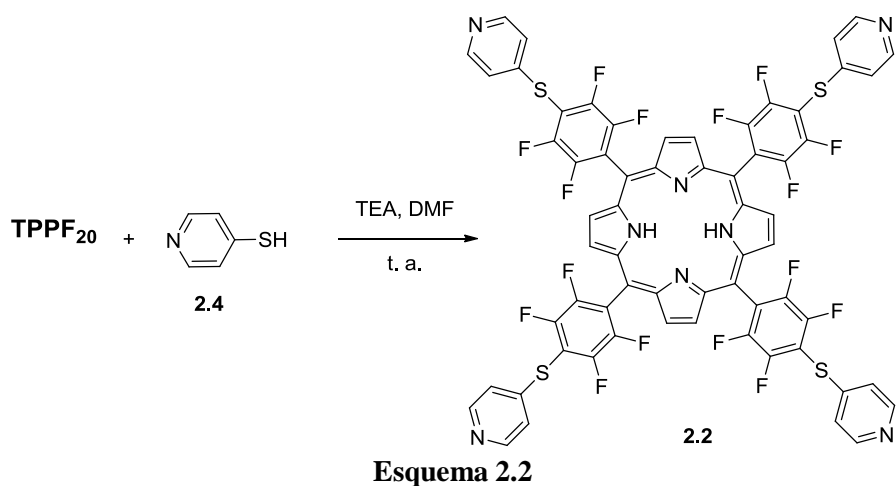


Figura 2.2 – Espectro de RMN de ^{19}F da TPPF₂₀, em CDCl₃.

2.2.2. Síntese da porfirina 2.2

A porfirina **2.2** foi preparada através da reação entre a TPPF₂₀ e 4-mercaptopiridina **2.4**, em dimetilformamida (DMF), na presença de trietilamina (Et₃N), à temperatura ambiente (t. a.), segundo a metodologia reportada por Gomes *et al.* (Esquema 2.2).⁸⁰



O composto **2.2** foi caracterizado por RMN de ^1H e ^{19}F (realizados em DMSO-d_6). O espectro de RMN ^1H apresenta dois sinais na forma de singuleto a δ -3.08 e a 9.59 ppm, tal como no espectro da porfirina de partida **TPPF**₂₀, e dois dupletos, a δ 7.73 ($J = 5.0$ Hz) e a 8.64 ppm ($J = 5.0$ Hz), correspondentes à ressonância dos oito *orto* e oito *meta* prótons dos grupos piridilo, respetivamente. O primeiro sinal diz respeito à ressonância dos prótons -NH e o último, a campo mais baixo, corresponde à ressonância dos oito prótons β -pirrólicos. O espectro de RMN de ^{19}F da porfirina **2.2** confirmou a substituição dos quatro *para* flúores pela 4-mercaptopiridina, devido ao desaparecimento do sinal correspondente à ressonância dos quatro *para* flúores. As ressonâncias do *orto* e *meta* flúores aparecem na forma de dois duplos dupletos ($J = 11.3$ Hz) a δ -155,25 e a δ -151.04 ppm.

2.2.3. Síntese da porfirina 2.3

A porfirina **2.3** apresenta um grupo piridona em cada posição *para* do grupo fenilo foi preparada por derivatização da porfirina **2.1** pela adição de 4-hidroxipiridina **2.5** (4 eq).

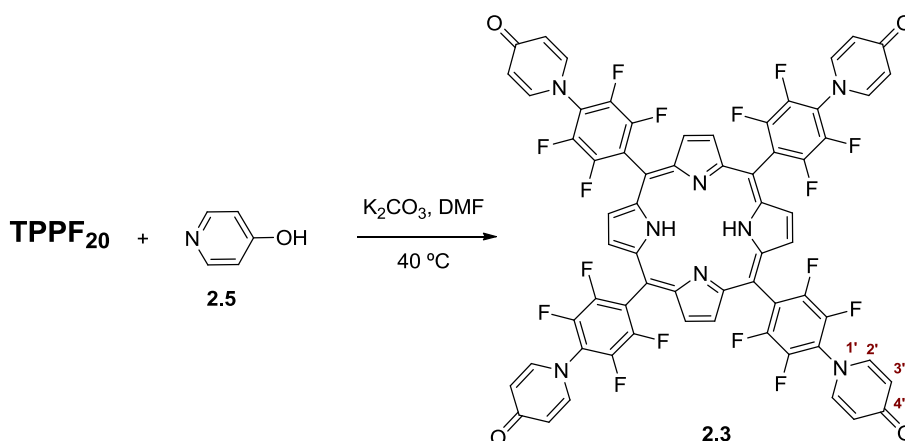
A obtenção deste produto foi um tanto ao quanto inesperada, dado que o tipo de composto que se esperava seria semelhante à porfirina **2.2**. Contudo, testaram-se várias condições e além do rendimento da reação ser muito inferior, a mistura apresentou um processo de separação, purificação e até metilação, amplamente moroso comparativamente com o anterior, como mostraremos ao longo deste capítulo.

Inicialmente foram testadas as condições abaixo sumariadas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Condições testadas para otimização da síntese da porfirina **2.3**.

Solvente	Base	Temperatura / °C	Tempo / min
DMF	K ₂ CO ₃	25	16
DMSO	TEA	100	120
DMSO	NaH	100	15
NMP	TEA	100	120

Contudo, as melhores condições conseguidas são apresentadas no Esquema 2.3, sendo de realçar que a reação é totalmente inviável na presença de tolueno, como solvente, pois a 4-hidroxipiridina é insolúvel neste solvente. Além das reações em condições clássicas também se recorreu reações assistidas por radiação micro-ondas (800 W, dois impulsos de 2.5 min em NMP, K₂CO₃), contudo os resultados foram semelhantes aos obtidos para as condições clássicas.


Esquema 2.3

Ao fim de uma hora, a 40 °C, verificou-se por TLC que praticamente toda a porfirina de partida tinha sido consumida, tendo-se, contudo, formado pelo menos cinco produtos. Assim resolveu-se terminar a reação. O K₂CO₃ foi filtrado e a mistura precipitada em tolueno. Após recolha do precipitado, a mistura foi cromatografada em coluna. As três frações menos polares foram eluídas em diclorometano/metanol (95:5), a quarta fração foi separada com a razão 90:10 de diclorometano/metanol e, finalmente, a fração mais polar foi recolhida em 85:15 de diclorometano/metanol. A fração mais polar, obtida com um rendimento de 15%, foi caracterizada por RMN de ¹H, ¹⁹F e ¹³C, tendo sido identificada como sendo a porfirina **2.3**. Os espectros de RMN dos compostos

foram feitos em DMSO deuterado, devido à sua baixa solubilidade em solventes comuns menos polares. Quanto ao espectro de RMN de ^1H (Figura 2.3), todos os sinais surgem na zona aromática, donde destacamos um singuleto a δ 9.47 ppm correspondente à ressonância dos oito prótons β -pirrólicos do macrociclo. A ressonância dos oito prótons H-2' e H-3' dos grupos piridona surgem sob a forma de um duplete, respetivamente a δ 8.21 e 6.55 ppm ($J = 7.8$ Hz). Os prótons H-2' absorvem a campos mais baixos do que os prótons H-3', devido ao efeito desprotector do grupo carbonilo, por ressonância.

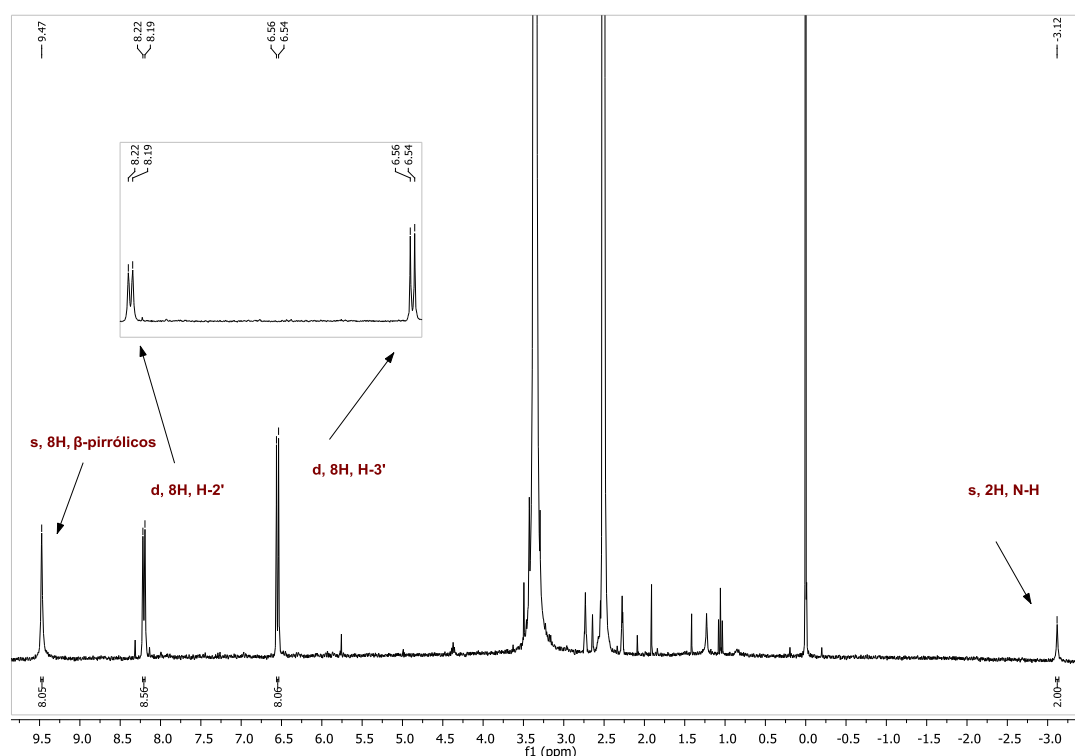


Figura 2.3 – Espectro de RMN de ^1H da porfirina **2.3**, em DMSO.

Relativamente ao espectro de RMN de ^{19}F (Figura 2.4), apresenta dois sinais diferentes. A δ -162.31 ppm, surge, na forma de duplo duplete, o sinal referente à ressonância dos oito átomos de flúor *orto*, mais desprotegidos devido à sua maior proximidade ao macrociclo tetrapirrólico. A δ -172.64 ppm surge também na forma de duplo duplete, o sinal referente à ressonância dos oito átomos de flúor *meta* (em relação ao macrociclo). Quanto ao espectro de RMN de ^{13}C (Figura 2.5), devido à baixa solubilidade do composto, mesmo após 16 horas de análise, o espectro obtido apenas permite identificar os carbonos referentes aos grupos piridona. No entanto, a presença de um sinal a δ 178 ppm, característicos da ressonância de grupos carbonilo, indica que a substituição dos *para* flúores se deu pelo átomo azoto da 4-hidroxipiridina e não pelo grupo hidroxilo.

Os dois restantes sinais correspondem às ressonâncias de C-2' e C-3', respetivamente, a δ 142 e a δ 119 ppm. O grupo carbonilo desprotege, por ressonância os carbonos da posição 2', fazendo-os mais desprotegidos que os C-3'.

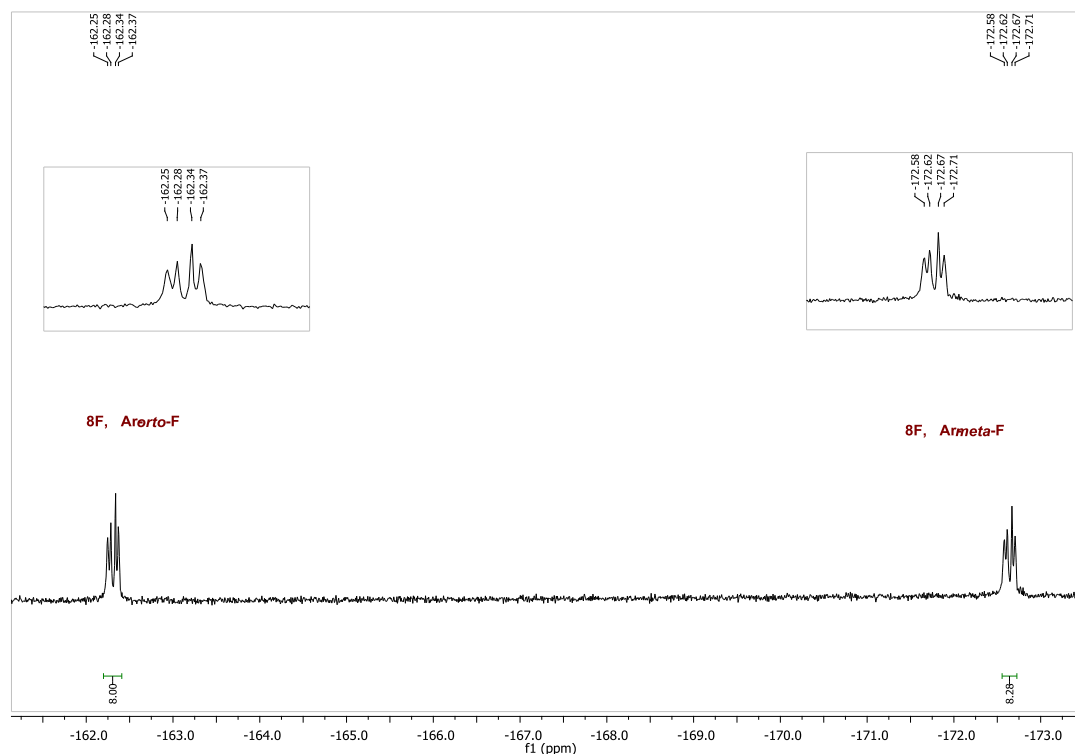


Figura 2.4 – Espectro de RMN de ^{19}F da porfirina **2.3**, em DMSO-d_6 .

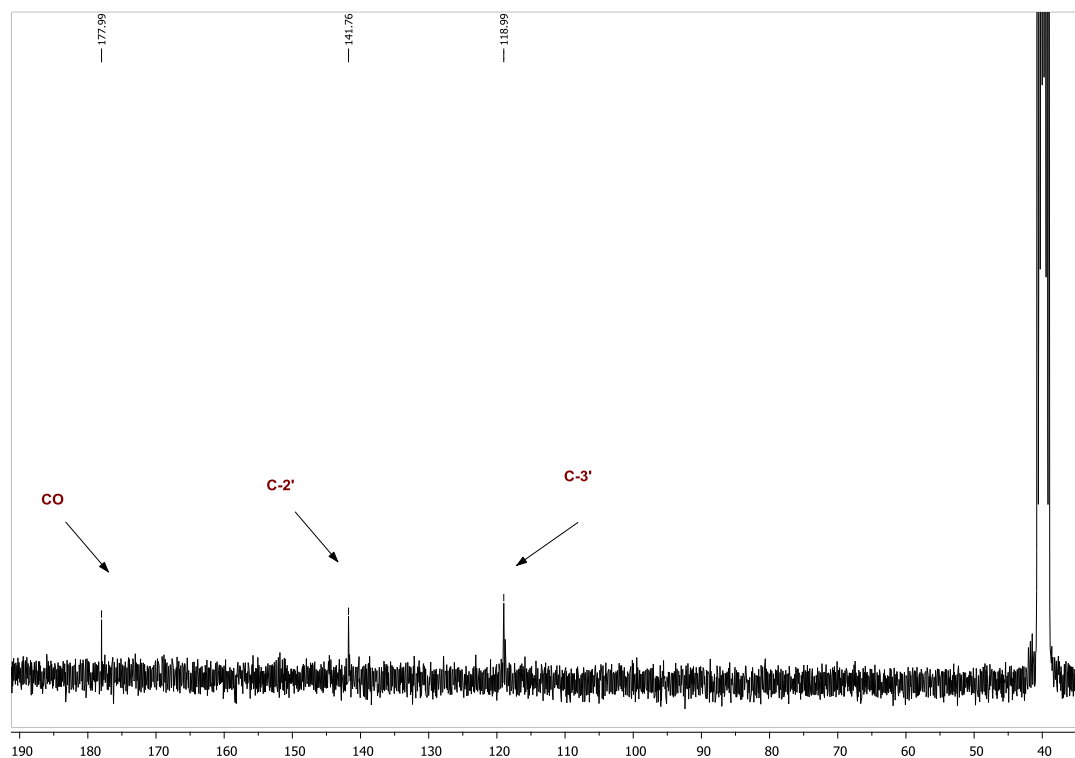
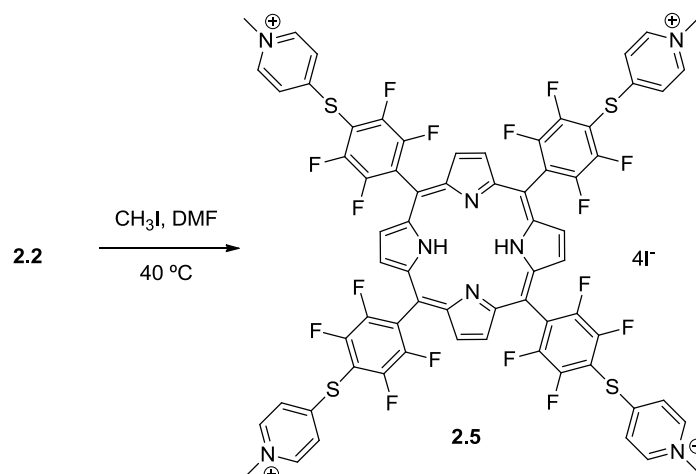


Figura 2.5 – Espectro de RMN de ^{13}C da porfirina **2.4**, em DMSO-d_6 .

2.2.4. Cationização da porfirina 2.2

A cationização da porfirina **2.2** foi levada a cabo em DMF seca, adicionando um largo excesso de iodeto de metilo, relativamente à quantidade de porfirina usada, seguindo a metodologia reportada por Gomes *et al* (Esquema 2.4).⁸⁰



Esquema 2.4

O composto catiónico foi caracterizado por RMN de ^1H (em DMSO) e espectroscopia de UV-vis. Quanto ao espectro de RMN de ^1H este apresenta, tal como o derivado neutro, o sinal correspondente à ressonância dos prótons dos azotos internos do macrociclo (-NH), na forma de singuleto largo, a δ -3.06 ppm. A δ 9.66 ppm, tal como na porfirina neutra, surge na forma de singuleto, o sinal correspondente à ressonância dos oito prótons β -pirrólicos, os mais desprotegidos devido ao efeito de desproteção da corrente do anel. O sinal mais característico, que prova a cationização dos quatro átomos de azoto periféricos, surge a δ 4.38 ppm, na forma de singuleto. Os restantes sinais, comparativamente à espécie neutra, sofreram um ligeiro deslocamento para campos mais baixos, devido ao efeito desprotector da carga positiva dos azotos da periferia do anel. A δ 8.97 ppm observa-se, na forma de duplete o sinal que diz respeito à ressonância dos oito prótons *meta* dos grupos piridínio e a δ 8.48 ppm surge o sinal correspondente à ressonância dos oito prótons *orto* dos grupos piridínio, também na forma de duplete (Figura 2.6).

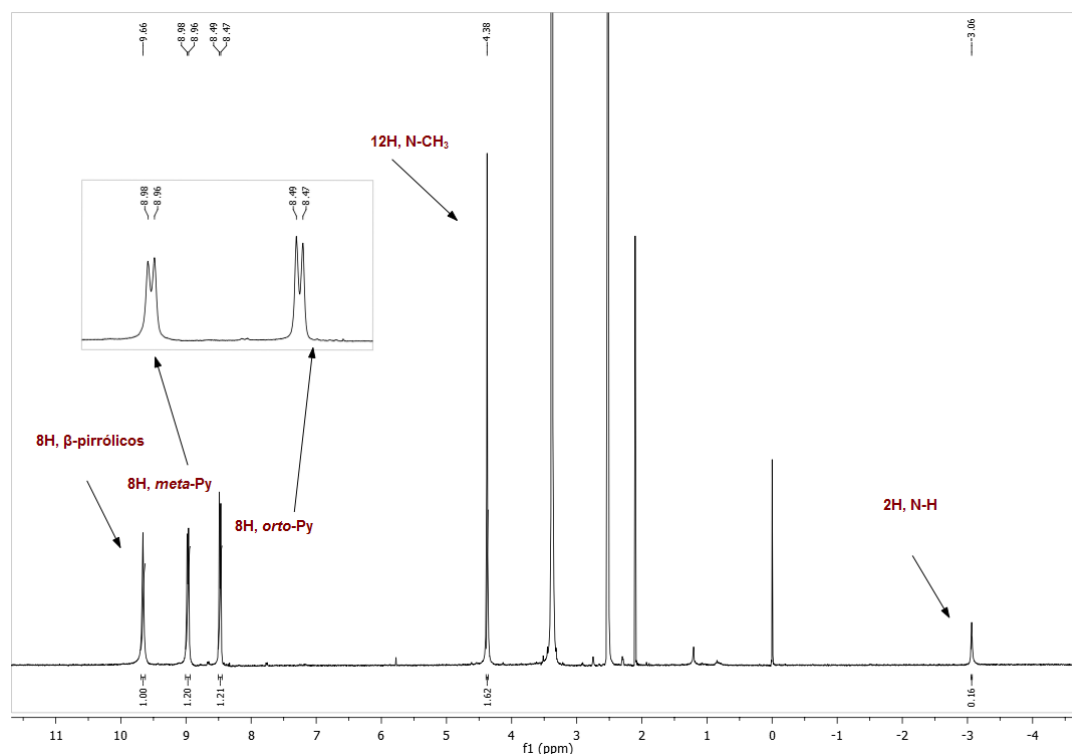


Figura 2.6 – Espetro de RMN de ^1H da porfirina **2.5**, realizado em DMSO-d_6 .

Quanto ao espectro de UV-Vis, realizado em DMSO este composto apresenta uma banda Soret com máximo de absorvência a 416 nm e três bandas Q de intensidade muito reduzida a 507, 581 e 655 nm (Figura 2.7).

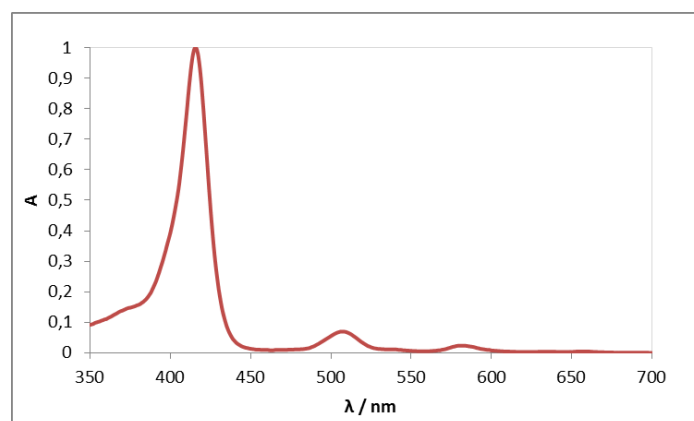


Figura 2.7 – Espetro UV-Vis da porfirina **2.5**, em DMSO.

2.2.5. Cationização da porfirina 2.3

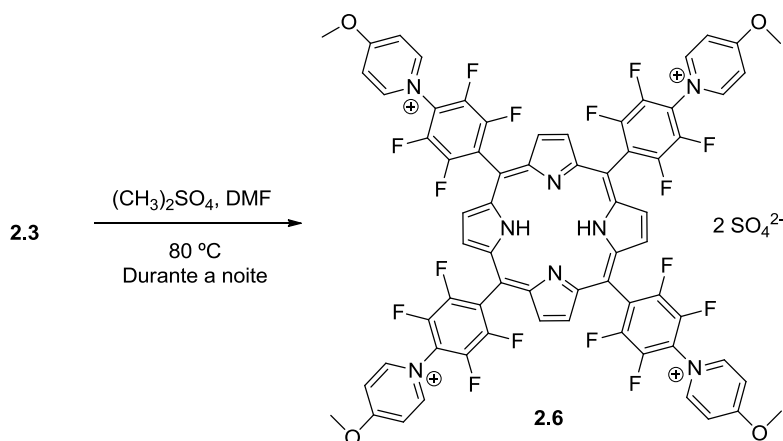
Para a metilação da porfirina **2.3**, primeiramente, recorreu-se às condições apresentadas na Tabela 2.2a para síntese do composto **2.6**. Contudo, tais condições não permitiram obter o composto metilado e que poderá dever-se, ao facto desta reação necessitar de uma maior energia de ativação, o que nos levou a experimentar condições

de temperatura mais elevada. (Tabela 2.2b e c). Contudo, a reação também não ocorreu; este facto poderá ser explicado por, possivelmente, o iodeto de metilo, com o aumento da temperatura (p.e. = 42-43 °C), se vaporizar no tubo selado, não estando assim, disponível para reagir com a porfirina.

Tabela 2.2 – Condições testadas para a otimização da cationização da porfirina **2.3**.

	Agente Metilante	Temperatura / °C
a	CH ₃ I	40
b	CH ₃ I	80
c	CH ₃ I	100

Alterarmos, então, o agente metilante para sulfato de dimetilo, nas condições referidas no Esquema 2.5. Esta reação foi realizada em DMF seca adicionando-se um largo excesso de sulfato de dimetilo relativamente à quantidade de porfirina usada. A reação foi mantida a 80 °C, durante a noite. Depois de arrefecida a mistura reacional, o produto da reação foi maioritariamente precipitado por adição de éter etílico.



Esquema 2.5

Dado o éter etílico não ser muito miscível com o sulfato de dimetilo foi necessário destilá-lo, tendo-se mantido o balão de recolha num banho de gelo. Após precipitação e reprecipitação numa mistura acetona/água, o produto cationico foi obtido com um rendimento de 80%. O composto **2.6** foi caracterizado por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{19}F , em DMSO- d_6 . No espectro de RMN de ^1H , o singuleto que surge a δ 4.38 ppm é o sinal mais característico, sendo atribuído à ressonância dos prótons dos grupos metilo inseridos. Ainda na zona aromática, comparativamente ao respetivo

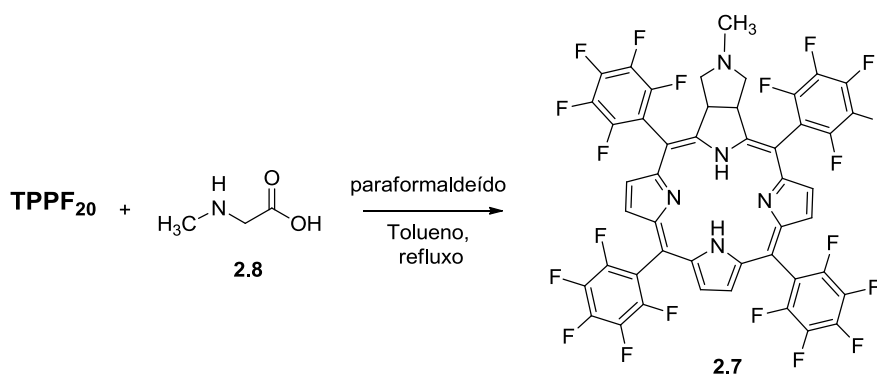
composto neutro, houve um desvio para campos mais baixos dos sinais correspondentes à ressonância dos prótons dos grupos piridona. A maior diferença é notada no entanto nos sinais referentes à ressonância dos prótons H-2' que antes da cationização se encontravam a cerca de δ 8.26 ppm e após essa reação sofreram um deslocamento para cerca de δ 9.48 ppm caindo mesmo na zona do sinal correspondente à ressonância dos prótons β -pirrólicos. Tal facto deve-se ao efeito desprotector (sacador) da carga positiva alojada no azoto, sobre estes prótons. Quanto ao espectro de RMN de ^{19}F observam-se dois sinais, na forma de multipletos de δ -172.54 a -172.62 ppm e de δ -162.31 a -162.39 ppm, correspondentes aos *meta* flúores e aos *orto* flúores, respetivamente.

Dado que o sinal atribuído à ressonância dos prótons dos grupos metilo se apresenta na mesma zona que o sinal referente aos prótons N-CH₃ da porfirina **2.6**, não é possível confirmar se a reação de metilação ocorre nos grupos carbonilo ou nos átomos de azoto dos grupos piridona, sem a realização de um espectro de RMN de ^{13}C ou um espectro bidimensional HMBC, que não houve oportunidade de obter até à data de entrega da dissertação.

2.3. Síntese de clorinas *meso*-tetra-substituídas

2.3.1. Síntese da *meso*-tetraquis(pentafluorofenil)clorina

A obtenção da clorina *meso*-tetraquis(pentafluorofenil)clorina **2.7** compreendeu a aplicação do método reportado por Silva *et al*, usando a TPPF₂₀, como dipolarófilo, e o ileto de azometino formado *in situ* pela reação entre a sarcosina **2.8** e o paraformaldeído, em tolueno, através de um reação de cicloadição 1,3-dipolar (Esquema 2.6).⁴³



Esquema 2.6

A evolução da reação foi acompanhada por placas de cromatografia em camada fina (TLC). A reação foi terminada sem que todo o reagente de partida tivesse sido consumido, tendo-se efetuado apenas duas adições de sarcosina e formaldeído (a reação teve a duração total de 6 horas e 30 minutos, tendo a segunda adição de sarcosina e formaldeído ocorrido após 4 horas de reação), com o intuito de limitar a formação de outros produtos secundários (tais como, bacterioclorina e isobacterioclorina). O solvente foi reduzido por evaporação e a mistura submetida a cromatografia em coluna (sílica gel), na qual usando uma mistura de diclorometano/éter de petróleo (4:1), como eluente, permitiu não só a recuperação da porfirina de partida que não reagiu, mas também de uma segunda fração identificada como sendo a clorina **2.7**, com o rendimento de 37%.

O composto **2.7** foi caracterizado por espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-vis), RMN de ^1H e de ^{19}F . Os espectros de RMN foram realizados em CDCl_3 . O espectro de UV-vis deste composto é um espectro típico de um derivado tetrapirrólico do tipo clorina, apresentando uma banda Q intensa a 651 nm (Figura 2.8). O espectro de RMN de ^1H da clorina **2.7** apresenta, na região alifática, um singuleto a δ 2.21 ppm, correspondente à ressonância dos prótons N-CH₃ e dois multipletos a δ 2.52-2.56 ppm e 3.11-3.16 ppm, correspondentes à ressonância dos prótons metilênicos. A δ 5.24-5.29 ppm, na forma de multiplete, surge o sinal correspondente à ressonância dos dois prótons β -pirrólicos do anel reduzido. Na região aromática, os sinais correspondentes à ressonância de quatro dos restantes seis prótons β -pirrólicos aparecem na forma de dois dupletos, a δ 8.40 e 8.71 ppm ($J = 4.9$ Hz), e sob a forma de um singuleto surge o sinal correspondente à ressonância dos dois outros prótons β -pirrólicos, a δ 8.48 ppm. Quanto ao espectro de RMN de ^{19}F , este apresenta três conjuntos de sinais, correspondentes à ressonância dos átomos de flúor dos anéis pentafluorofenilo, os *meta* flúores os mais protegidos, os *para* flúores; e a campos mais baixos os *orto* flúores.

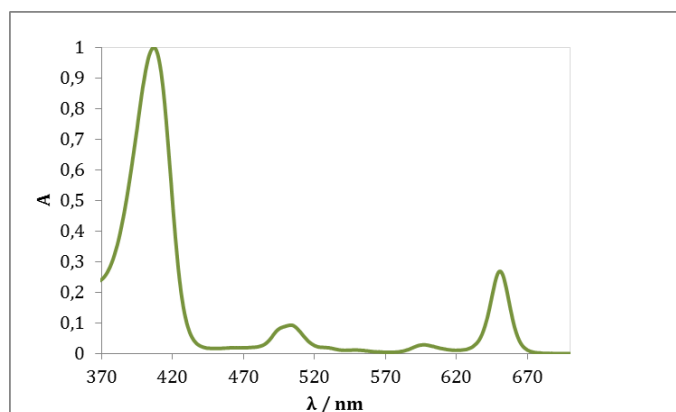
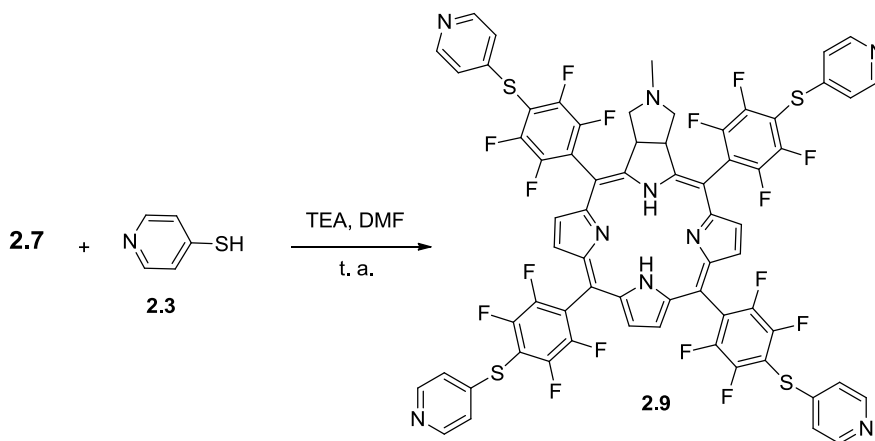


Figura 2.8 – Espectro de UV-Vis da clorina **2.7**, em DMSO.

2.3.2. Síntese da clorina 2.9

A preparação da clorina **2.9** teve por base a metodologia utilizada na síntese da porfirina **2.2**. Deste modo fez-se reagir a clorina **2.7** com 4-mercaptopiridina **2.3**, em dimetilformamida (DMF), na presença de trietilamina (Et₃N) (Esquema 2.7). A reação deu-se por terminada após uma hora, depois de ter sido consumido todo o reagente de partida. A reação foi controlada por TLC que, revelou a presença de quatro compostos com factores de retenção (R_f) bastante próximos, sendo o mais polar o componente maioritário. A mistura reacional foi neutralizada com uma solução saturada de ácido cítrico e a fase orgânica extraída com diclorometano. O componente maioritário da mistura foi separado através de cromatografia de camada fina preparativa, usando diclorometano/metanol (96:4) como eluente, tendo sido identificado como sendo a clorina **2.9**, com o rendimento de 79%.



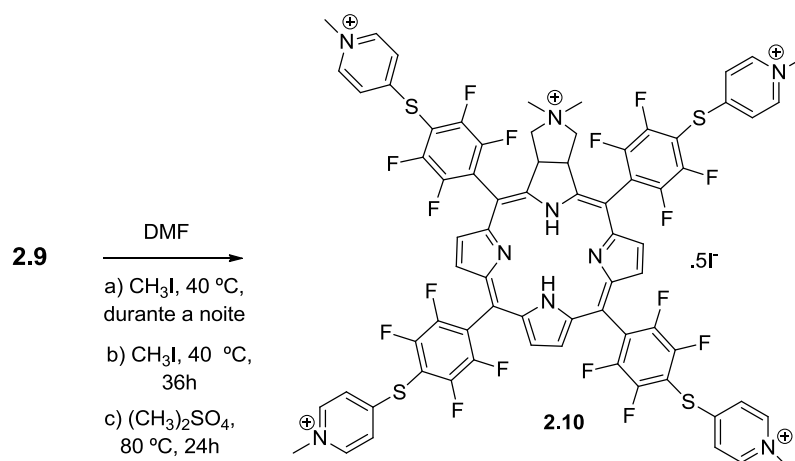
Esquema 2.7

A clorina obtida foi caracterizada por espectroscopia de UV-vis, RMN de ¹H e de ¹⁹F, assim como espetrometria de massa, MALDI-TOF de alta e baixa resolução. O espectro de UV-vis deste composto é, idêntico ao da clorina de partida. Quanto ao espectro de RMN de ¹H é possível observar na zona alifática quatro sinais. O primeiro deles a δ -1.7 ppm, na forma de singuleto, diz respeito à ressonância dos dois prótons -NH do interior do macrociclo, mais protegidos do que os prótons do TMS, devido à elevada corrente eletrónica do anel. Os restantes três sinais, tal como o primeiro, são comuns à clorina de partida **2.7**, nomeadamente, um singuleto a δ 2.24 ppm, correspondente à ressonância dos prótons N-CH₃ e dois multipletos a δ 2.64-2.67 e a δ 3.13-3.18 ppm, correspondentes à ressonância dos prótons metilénicos. A δ 5.36-5.39 ppm, na forma de multiplete, surge o sinal correspondente à ressonância dos dois prótons β -pirrólicos do anel reduzido. Na região aromática, os sinais correspondentes à

ressonância de 4 dos 6 prótons β -pirrólicos aparecem na forma de dois dupletos, a δ 8.49 e 8.81 ppm e na forma de um singuleto surge o sinal correspondente à ressonância dos dois restantes prótons β -pirrólicos, a δ 8.58 ppm. Podem também observar-se dois multipletos correspondentes à ressonância dos prótons *orto* a 7.29-7.34 ppm e a 8.62-8.64 ppm dos prótons *meta* dos anéis piridínicos. O espetro de RMN de ^{19}F comprova a substituição dos quatro *para* flúores, devido ao desaparecimento do sinal correspondente à sua ressonância. Assim são observáveis dois conjuntos de sinais correspondentes aos *meta* flúores e aos *orto* flúores, dos anéis pentafluorofenilo. A espetrometria de massa em “electrospray” comprova também a estrutura da clorina tetra-substituída, apresentando o valor de (m/z) 466.05 (M^{3+}), 698.58 (M^{2+}) para o ião molecular.

2.3.3. Cationização da clorina 2.9

Para metilação da clorina **2.9** recorreu-se, primeiramente, às condições apresentadas no Esquema 2.8 a), visando a obtenção do composto **2.10**. Contudo, por análise espectroscópica de RMN de ^1H e ^{19}F e UV-vis verificou-se que a cationização não teria sido total. Este facto poderá estar relacionado com a necessidade de esta reação levar mais tempo a ficar completa visto apresentar cinco átomos de azoto suscetíveis de sofrerem alquilação.



Esquema 2.8

A obtenção do composto penta-catiónico **2.10**, através da metilação dos cinco azotos externos da molécula foi conseguida recorrendo a uma variante do método reportado por Vinhado *et al*, para metilação da **2.9** (Esquema 2.8, b) e c)).¹¹⁴

A cationização da clorina **2.9** ocorreu pela adição de um largo excesso de iodeto de metilo a uma suspensão do composto **2.9**, em DMF, durante 36 horas (ao fim de 24 horas fez-se um TLC que mostrou evidências de que a reação ainda não estaria completa, então deixou-se reagir mais 12 horas), a 40 °C. Depois de arrefecida a mistura reacional, o produto foi precipitado por adição de éter etílico. Após a precipitação, o produto foi filtrado e dissolvido em metanol, lavado com diclorometano e reprecipitado (três vezes), numa mistura de metanol/diclorometano. O composto metilado (foi seco na bomba de vácuo, a 70 °C, durante 4h e durante a noite na estufa (Esquema 2.8 b)).

Com o intuito de reduzir o tempo de reação experimentaram-se também as condições reacionais apresentadas no Esquema 2.8 c), recorrendo ao sulfato de dimetilo [(CH₃)₂SO₄], como agente metilante. Contudo o produto formado necessitou de um processo de purificação consideravelmente moroso, comparativamente ao primeiro. Aquando da adição do éter etílico formaram-se duas fases imiscíveis, o que impediu a precipitação do composto. A precipitação só foi conseguida, após destilação, durante a qual o balão de recolha foi mantido num banho de gelo, dissolvendo o resíduo no mínimo de água possível, e adicionando acetona. O restante tratamento foi idêntico ao utilizado na metilação com iodeto de metilo (CH₃I).

A clorina **2.10** foi caracterizada por espectroscopia de UV-vis, RMN de ¹H e de ¹⁹F. O espectro de RMN de ¹H revela que todos os sinais sofreram deslocação para campos mais baixos, comparativamente com o mesmo espectro para o derivado neutro. Sendo assim da zona aromática fazem parte os sinais correspondentes à ressonância de 6 dos 8 prótons β-pirrólicos, 4 sob a forma de dois dupletos, a δ 9.38 e 9.01 ppm e a δ 8.96 ppm surge, sob a forma de um singuleto, o sinal correspondente à ressonância dos outros dois prótons β-pirrólicos. Podem também observar-se dois singuletos a δ 8.85 e 8.22 ppm correspondentes à ressonância dos prótons *meta* e *orto* dos anéis piridínicos. Na zona alifática surge um singuleto a δ 4.43 ppm, correspondente à ressonância dos prótons N-CH₃ dos grupos piridínio e dois singuletos largos a δ 4.60 e 3.93 ppm, correspondentes à ressonância dos prótons metilénicos. A δ 6.21 ppm, na forma de singuleto, surge o sinal correspondente à ressonância dos dois prótons β-pirrólicos do anel reduzido. A δ 3.21 e 3.64 ppm surgem os sinais correspondentes aos seis prótons N-CH₃ da pirrolidina, na forma de singuleto (Figura 2.9).

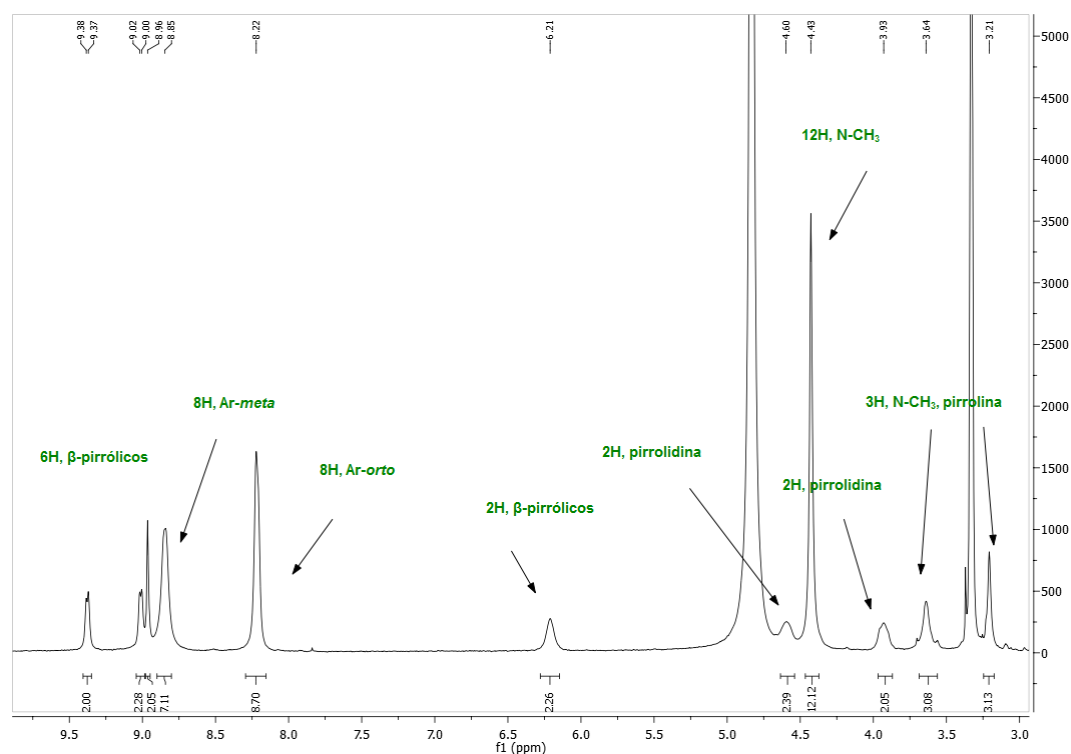


Figura 2.9 – Espetro de RMN de ^1H da clorina **2.10**, em DMSO-d_6 .

O espectro de RMN de ^{19}F não sofreu grande alteração em relação ao derivado neutro, ou seja, apresenta dois conjuntos de sinais correspondentes aos *meta* flúores e aos *orto* flúores, dos anéis pentafluorofenilo, de δ -152.04 a 155.11 ppm e de δ -158.46 a -160.49 ppm. A espectrometria de massa em “electrospray” comprova também a estrutura da clorina tetra-substituída catiônica, apresentando os valores de m/z 466.05 (M^{3+}), 698.58 (M^{2+}).

Quanto ao espectro de UV-vis, realizado em dimetilsulfóxido (DMSO), (Figura 2.10) apresenta também o espectro típico de um derivado do tipo clorina. A sua banda Soret surge a 409 nm, e as suas bandas Q a 503, 597 nm e a mais típica, a 650 nm, caracterizada pela sua maior intensidade.

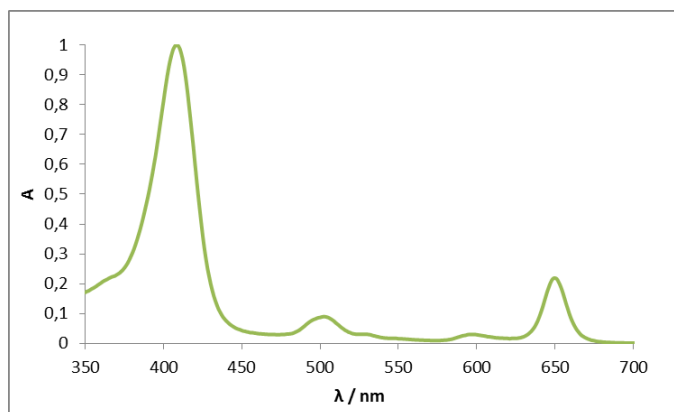


Figura 2.10 – Espetro de UV-vis da clorina **2.10**, em DMSO.

2.3.4. Reações da TPPF₂₀ com *orto*-quinonas metídiot

Como o objetivo inicial deste trabalho passava ainda pela preparação de outros derivados do tipo clorina da TPPF₂₀ através de reações de cicloadição, de Diels-Alder. Tendo em conta a premissa de que porfirinas *meso*-substituídas com grupos sacadores de elétrons funcionam bem em reações deste tipo com dienos ricos em elétrons, na preparação de clorinas, iniciou-se o estudo da derivatização da TPPF₂₀ com *orto*-quinonas metídeo, geradas *in situ*. Para isso foram selecionados a 4-hidroxycumarina, a 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (Lawsona) e ainda o álcool 2-hidroxibenzílico (Figura 2.11). Tais espécies foram escolhidas por terem sido reportadas por Ferreira *et al.* como precursores de dienos capazes de formar aductos de ciclização, *via* reação de cicloadição do tipo referido, bem como apresentarem interessantes propriedades antimicrobianas, ou originando compostos com ótimas propriedades biológicas.¹¹³

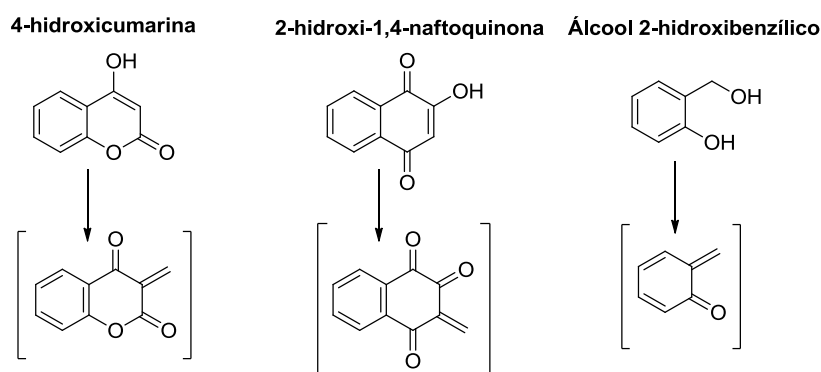
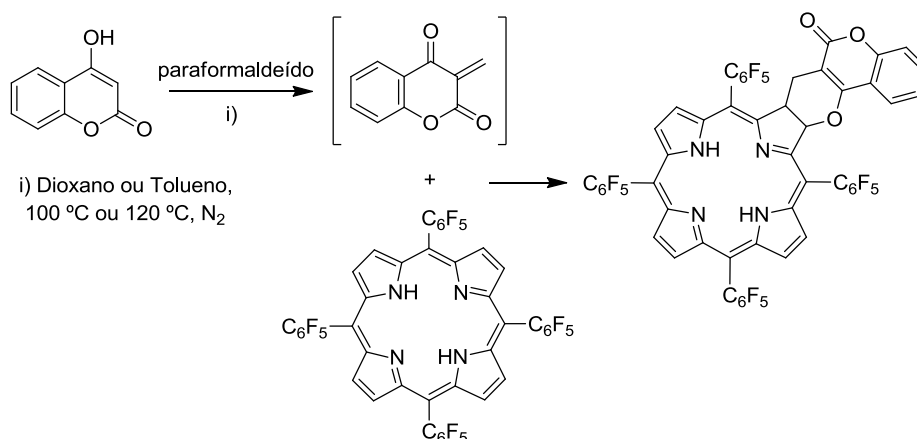


Figura 2.11 – Estrutura dos compostos, e respetivos dienos gerados *in situ*, utilizados nas reações de Diels-Alder com a TPPF₂₀.

Tendo em conta que, pelo menos os dois primeiros reagentes originam dienos “pobres” em elétrons, e sendo o *core* da porfirina usada também “pobre” em elétrons, não era esperada a obtenção de rendimentos elevados. No entanto, existia a convicção de que se conseguiria a preparação de novas clorinas, ainda que em rendimentos moderados, que posteriormente permitissem, por substituição dos *para* flúores, obter derivados solúveis em água, tal como no caso das porfirinas **2.5** e **2.6** e da clorina **2.10**.

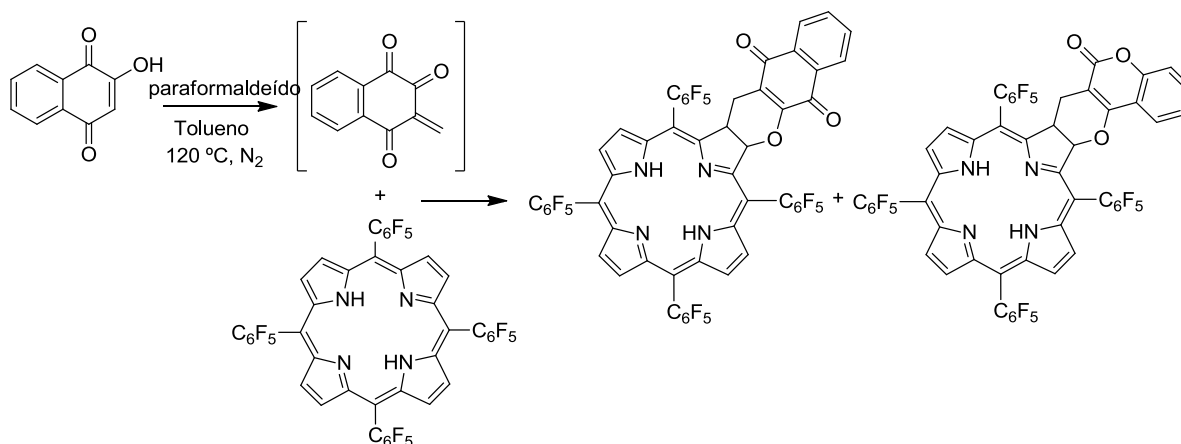
Tendo iniciado estes estudos com a 4-hidroxycumarina (Esquema 2.9) e a Lawsona (Esquema 2.10), apesar de vários protocolos utilizados, confirmou-se as nossas piores expectativas, uma vez que não conseguimos obter/isolar/caracterizar qualquer produto das reações. Em baixo descrevo os procedimentos experimentais testados.



Esquema 2.9

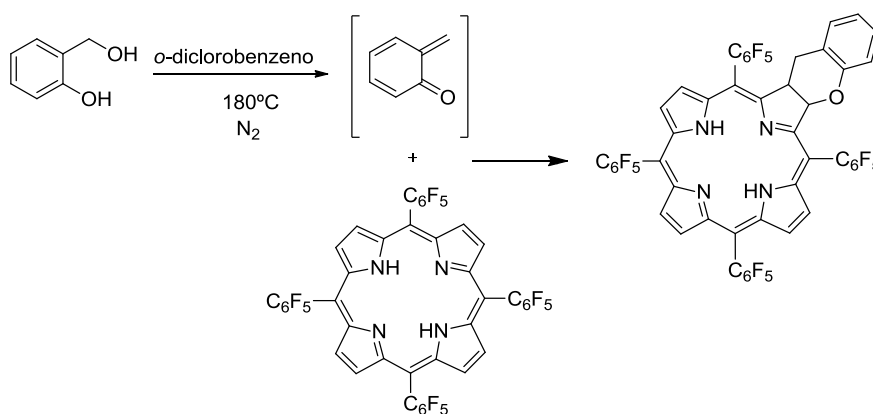
Colocou-se durante um hora, em refluxo, uma mistura de 20 mg de **TPPF₂₀** (0.02 mmol), 2.44 mg de paraformaldeído (0.1 mmol, 8 eq.) e 16.5 mg de 4-hidroxicumarina (0.01 mmol, 2 eq.), em 2 ml de dioxano, sob atmosfera de azoto. Ao fim de uma hora controlou-se a reação por TLC, e observou-se que para além de ainda existir a maioria de porfirina por reagir, apenas se observava uma mancha bem na base do TLC. Decidiu-se então, estender o tempo de reação até três dias, acompanhado de três adições sucessivas, por dia. Tal metodologia, assim como a troca de solvente – para tolueno – em nada melhoraram os resultados (embora com a reação em tolueno a percentagem de formação de polímeros fosse menor). Não foi possível, então sintetizar o requerido PS de “2^a geração”. (Esquema 2.9)

Experimentou-se um outro composto, a 2-hidroxi-1,4-naftoquinona, também designado por lawsona (Esquema 2.10). Seguindo a metodologia utilizada para o derivado anterior, insistentemente não se obtiveram aductos possíveis de caracterizar.



Esquema 2.10

Tendo em conta os resultados obtidos com a 4-hidroxycumarina e a Lawsona, decidiu-se experimentar o derivado álcool 2-hidroxibenzílico, precursor de um dieno mais reativo. Apesar de mais reativo e das várias tentativas de reação (Esquema 2.11) levaram apenas à formação de produtos em muito pequena quantidade, tendo apenas sido possível verificar por TLC e UV-vis tratar-se de uma mistura de clorinas (Figura 2.12). Fica também aqui documentado os procedimentos utilizados.



Esquema 2.11

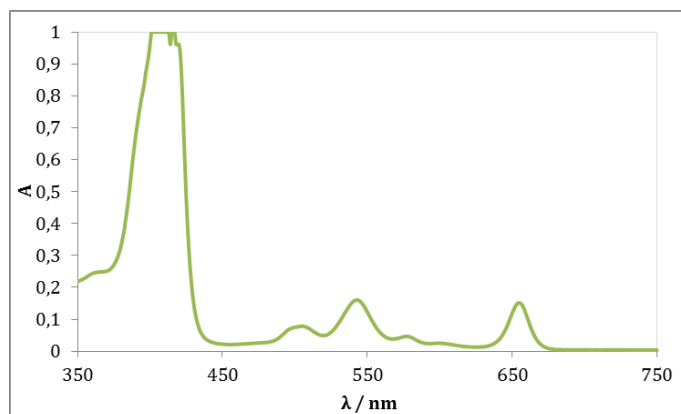


Figura 2.12 – Espectro de absorção UV-vis da fração recolhida na coluna.

Num balão de fundo redondo colocou-se 20 mg de **TPPF₂₀** (0.02 mmol) e 12.8 mg do álcool 2-hidroxibenzílico (0.1 mmol, 5 eq.), em 2 mL de *o*-diclorobenzeno, a refluxo, sob atmosfera de azoto. Após uma hora controlou-se por TLC, onde se verificou que quase todo reagente de partida se encontrara ainda intacto, contudo observou-se também uma forte base no TLC – possíveis aductos ou possível polimerização do reagente álcool. Adicionaram-se mais cinco equivalentes de álcool e deixou-se sob agitação mais duas horas. Ao fim desse tempo, controlou-se novamente a reação por TLC, verificando a formação de três manchas cor-de-rosa muito próximas

(quase sobrepostas e de intensidade muito pequena) de polaridade superior à da porfirina de partida.

A reação foi mantida durante a noite, após a adição de mais 5 eq. de álcool e de manhã resolveu-se terminar a reação visto que tudo se encontrava de modo semelhante, com a exceção do aumento da base. Resolveu-se terminar a reação.

Tendo em conta este resultado, resolveu-se repetir a reação nas mesmas condições mas com um solvente que atingisse uma maior temperatura de refluxo e, consequentemente, pudesse fornecer uma maior energia de ativação – 1,2,4-triclorobenzeno (p.e. 214 °C). O controlo da reação foi realizado do mesmo modo que para o outro solvente, tendo-se verificado também a formação do mesmo tipo de produtos. Contudo a base observada já era bastante mais forte, mesmo ao fim de apenas uma hora de reação. Posto isto, deu-se por terminada a reação. Como os produtos obtidos ainda não tinham sido caracterizados, repetiu-se a reação, em diclorobenzeno de modo a obter maior quantidade de produto. A reação terminada foi submetida a cromatografia rápida em coluna. Recuperou-se o reagente de partida, usando como eluente uma mistura de diclorometano/éter (1:1). A fração cor-de-rosa foi separada em seguida com diclorometano e aplicada em placas de TLC preparativas. Contudo, não foi possível separar as três manchas presentes na segunda fração retirada da coluna, o que impossibilitou a caracterização de um produto puro.

A reação foi repetida noutras condições, nomeadamente, aumentando o tempo de reação para três dias, com três adições sucessivas de álcool, por dia; o recurso à radiação micro-ondas e reação a seco também foram testadas mas ambos conduziram a um mesmo resultado: nenhum produto obtido, a não ser os possíveis aductos ou polímeros de *o*-quinona metídeo; também se tentou usar um outro solvente, o éter di-etilglicol-di-metílico (diglime), mas não se obteve qualquer produto.

Devido ao avançar do tempo, e com estes resultados pouco encorajadores não foram experimentados novos derivados porfirínicos mais ricos em eletrões, como por exemplo a TPP. No entanto esta plataforma porfirínica não se apresenta como sendo um precursor de fácil obtenção de produtos solúveis em água.

2.4. Parte experimental

2.4.1. Reagentes e Equipamento

Os reagentes comerciais, de diversas marcas, foram usados sem qualquer purificação prévia uma vez que os seus graus de pureza assim o permitiam.

Os solventes utilizados nas transformações e cristalizações efetuadas eram analiticamente puros ou foram, sempre que necessário, purificados:

- a dimetilformamida foi seca em peneiros moleculares;
- o tolueno foi seco em fio de sódio.

Os solventes utilizados nas operações de purificação foram previamente destilados.

A evolução das reações foi seguida por TLC, usando pequenas folhas plastificadas revestidas de sílica gel 60 ou sílica gel 60 F₂₅₄.

Nas cromatografias de coluna utilizou-se sílica flash, da Merck.

As cromatografias de camada fina preparativas foram efetuadas em placas de vidro, previamente revestidas com uma camada de sílica gel 60 (Merck), com uma espessura de 0.5 mm, e ativadas na estufa a 100 °C durante 10 horas.

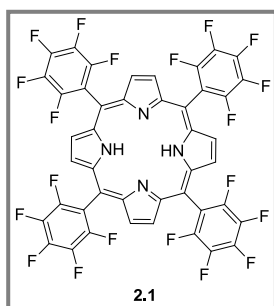
Os espetros de RMN de ¹H, ¹³C e ¹⁹F foram registados num aparelho Bruker Avance 300 a 300.13, 75.47 e 282.38 MHz, respetivamente ou num aparelho Avance 500 a 500.13 e 125.77 MHz para ¹H e ¹³C, respetivamente. Os desvios químicos (δ) são apresentados em ppm tendo-se usado o tetrametilsilano (TMS) como padrão interno (δ= 0 ppm).

Os espetros de massa foram realizados num espectrómetro de MALDI TOF/TOF 4800 Applied Biosystems, não tendo sido usada qualquer matriz. Os espetros de massa de “electrospray” de alta resolução foram efetuados na Universidade de Vigo, num espectrómetro APEXQe FT-ICR (Bruker Daltonics, Billerica, MA).

Os espetros de ultravioleta-visível foram registados num um espectrofotómetro UV-2501PC Shimadzu em células de vidro com percurso ótico de 1 cm.

2.4.2. Procedimentos

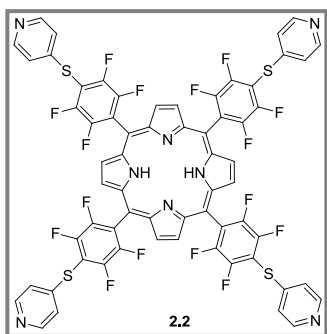
2.4.2.1. Síntese da porfirina 2.1



A uma mistura de ácido acético glacial (400 mL) e nitrobenzeno (300 mL) em refluxo, adicionou-se pentafluorobenzaldeído (8.00 mL, 64 mmol, 8 eq.). Em seguida, adicionou-se pirrol (5.00 mL, 72 mmol, 8 eq.), gota a gota, com a ajuda de um funil de carga. A mistura foi refluxada durante 1 hora. Findo esse tempo deixou-se arrefecer e quando o banho de óleo se encontrava a 40

°C iniciou-se a destilação, a pressão reduzida, do ácido acético glacial e do nitrobenzeno até à secura. O resíduo foi retomado em clorofórmio e separado por cromatografia rápida de coluna usando como eluente clorofórmio/éter de petróleo (1:1). Em seguida, evaporou-se o solvente e lavou-se o sólido obtido com metanol. O composto obtido foi identificado como sendo a porfirina **2.1** (1.0 g, 13%), após recristalização em diclorometano/metanol (1:1). **RMN de ^1H** (CDCl_3): δ -2.93 (s, 2H, NH), 8.92 (s, 8H, β -H). **RMN de ^{19}F** (CDCl_3): δ -160.04 ppm (dd, 8F, J = 23.3 e 8.7 Hz, Ar-*o*-F), -174.72 ppm (t, 4F, J = 19.4 Hz, Ar-*p*-F); -184.83 (ddd, 8F, J = 23.3; 19.4 e 8.7 Hz Ar-*m*-F).

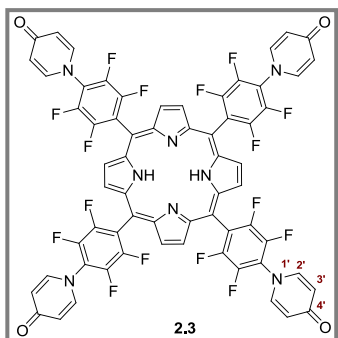
2.4.2.2. Síntese da porfirina 2.2



A uma solução de *meso*-tetraquis(pentafluorofenil)porfirina (100 mg, 0.1 mmol), em dimetilformamida seca (5 mL) foi adicionada 4-mercaptopiridina (47 mg, 0.4 mmol, 4.0 eq.) e dietilamina (1 mL). Essa mistura foi mantida sob agitação durante 1 h, sob atmosfera de azoto e à temperatura ambiente. Após a evaporação da DMF, sob pressão reduzida,

o resíduo foi submetido a cromatografia rápida de coluna, utilizando diclorometano e diclorometano/metanol (98:2), como eluentes. A porfirina **2.2** (120 mg, 90%) foi cristalizada em diclorometano/hexano (98:2). **RMN de ^1H** (DMSO-d_6): δ -3.08 (s, 2H, NH), 7.73 (d, J = 5.0 Hz, 8H, Ar-*o*-H), 8.64 (d, J = 5.0 Hz, 8H, Ar-*m*-H), 9.59 (s, 8H, β -H). **RMN de ^{19}F** (DMSO-d_6): δ -155.25 (dd, J = 11.3 e 25.4 Hz, 8F, Ar-F), -151.04 (dd, J = 11.3 e 25.4 Hz, 8F, Ar-F).

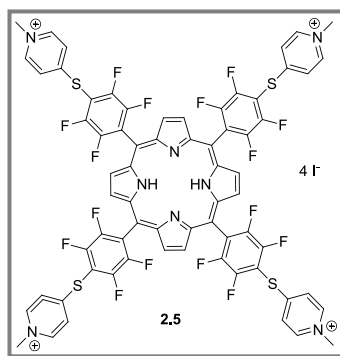
2.4.2.3. Síntese da porfirina 2.3



A uma solução de TPPF₂₀ (105 mg, 0.1 mmol), em DMF (6.25 mL), adicionou-se, gota a gota, 4-hidroxipiridina (40.2 mg, 0.4 mmol, 4.0 eq.) e carbonato de potássio anidro (250 mg). A mistura foi mantida em atmosfera de azoto, durante 1 hora, a 40 °C. Ao fim desse tempo, verificou-se por TLC que, todo o composto de partida tinha sido consumido e se tinham formado cinco diferentes compostos. Assim, a

mistura reacional foi neutralizada com uma solução saturada de ácido cítrico e a fase orgânica extraída com diclorometano/metanol (85:15); seca com sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado. Seguidamente, a mistura foi cromatografada, tendo sido as três frações menos polares eluídas com diclorometano/metanol (95:5), a quarta fração eluída com diclorometano/metanol (90:10) e, finalmente, a fração mais polar recolhida com diclorometano/metanol (85:15). As cinco frações foram identificadas como sendo, respetivamente, as porfirinas mono-, di-substituída em posições adjacentes, di-substituída em posições opostas, trissubstituída e tetra-substituída (porfirina **2.4**) (18 mg, 14%). Esta porfirina foi cristalizada usando uma mistura de diclorometano/etér de petróleo. **RMN de ¹H** (DMSO-d₆): δ -3.12 (s, 2H, NH), 6.55 (d, *J* = 7.8 Hz, 8H, H-3'), 8.21 (d, *J* = 7.8 Hz, 8H, H-2'), 9.47 (s, 8H, β-pirrólicos). **RMN de ¹⁹F** (DMSO-d₆): δ 172.64 (dd, *J* = 25.3 e 10.0 Hz, 8F, Ar-*m*-F), 162.31 (dd, *J* = 25.3 e 10.0 Hz, 8F, Ar-*o*-F). **RMN de ¹³C** (DMSO-d₆): δ 118.99 (C-3'), 141.76 (C-2'), 177.99 (CO).

2.4.2.4. Cationização da porfirina 2.2

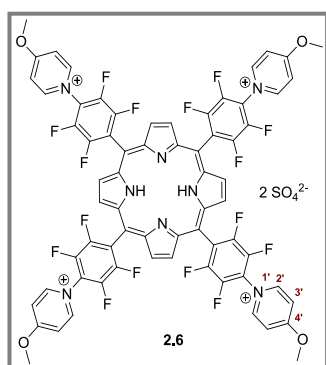


A uma suspensão da porfirina **2.2** (75 mg, 56.0 mmol) em DMF (15 mL) foi adicionado iodeto de metilo, em largo excesso (3 mL, 48.1 mmol). A mistura reacional foi mantida sob agitação, a 40 °C, durante a noite. Após este período, a mistura foi arrefecida e o produto precipitado com éter etílico. O precipitado foi filtrado e lavado com éter etílico. O produto foi retomado em acetona/metanol e

água destilada, e reprecipitado duas vezes, primeiro em acetona e, em seguida, em metanol. A porfirina metilada **2.5** foi filtrada, lavada com metanol e seca sob vácuo

originando um pó castanho-avermelhado (96 mg, 90%). **RMNde ^1H** (DMSO- d_6): δ - 3.06 (s, 2H, NH), 4.38 (12H, CH_3), 8.48 (d, $J = 5.5$ Hz, 8H, Py-*o*-H), 8.97 (d, $J = 5.5$ Hz, 8H, Py-*m*-H), 9.66 (s, 8H, β -H). **RMN de ^{19}F** (DMSO- d_6): δ -160.29 (dd, $J = 9.9$ e 28.2 Hz, 8F, Ar-F), -155.35 (dd, $J = 9.9$ e 28.2 Hz, 8F, Ar-F). **UV-vis** (DMSO) λ_{max} (ϵ): 416 (5.55) 507 (4.41), 581 (3.96) e 655 (3.49) nm.

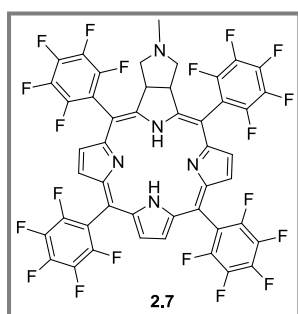
2.4.2.5. Cationização da porfirina 2.3



A uma suspensão da porfirina **2.3** (18 mg, 14.0 μmol) em DMF seca (10 mL), adicionou-se um largo excesso de sulfato de dimetilo (3 mL). A mistura reacional foi mantida em agitação durante a noite, a 80 °C num tubo selado. Terminado este período arrefeceu-se a mistura e dado que o éter etílico não é muito miscível com o sulfato de dimetilo foi necessário destilá-lo, mantendo o balão de recolha num

banho de gelo. Após precipitação o resíduo foi então retomado em acetona/água (1:1) e, após concentração, foi reprecipitado por adição de acetona. O produto obtido foi filtrado, lavado com acetona e seco sob vácuo tendo-se obtido o composto metilado **2.6** (15 mg, 80%), aproximadamente. **RMN de ^1H** (DMSO- d_6): δ -3.09 (s, 2H, NH), 4.38 (s, 12H, O- CH_3), 8.20 (d, 8H, Py-H-3'), 9.48 (s, 16H, Py-H-2' e β -H). **RMN de ^{19}F** (DMSO- d_6): δ -172.54 a -172.62 (m, 8F, Ar-*m*-F), -162.31 a -162.39 (m, 8F, Ar-*o*-F).

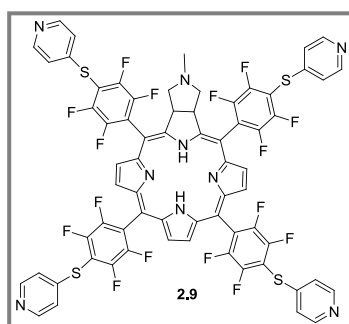
2.4.2.6 Síntese da clorina 2.7



Uma solução de **TPPF₂₀** (209.3 mg), sarcosina (34.7 mg, 0.4 mmol, 2 eq.) e paraformaldeído (33.7 mg, 5 eq.), em tolueno (40 mL), foi mantida a refluxo, durante quatro horas, sob atmosfera de azoto. Após esse tempo a TLC da mistura reacional mostrou que cerca de metade da porfirina de partida já tinha sido convertida em dois novos produtos – sendo o produto maioritário de cor verde. Adicionou-se, novamente, sarcosina (35.0 mg, 0.4 mmol, 2 eq.) e formaldeído (33.2 mg, 5 eq.) e decorridas mais duas horas e meia, deu-se por terminada a reação. O solvente foi evaporado e os componentes da mistura reacional foram separados por cromatografia em coluna. Usando diclorometano/éter de petróleo

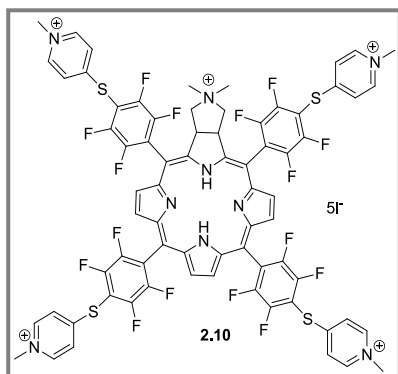
(4:1), como eluente, foi possível recuperar a porfirina de partida 2.1 (59.3 mg, 37%) e, seguidamente, a recolher a segunda fração que foi caracterizada e identificada como sendo a clorina **2.7** (110 mg, 37%). **RMN de ^1H** (CD_3Cl_3): δ 2.21 (s, 3H, N- CH_3), 2.52-2.56 (m, 2H, H-pirrolidina), 3.11-3.16 (m, 2H, H-pirrolidina), 5.24-5.29 (m, 2H, β -H), 8.40 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H, β -pirrólicos), 8.71 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H, β -pirrólicos), 8.48 (s, 2H, β -H-pirrólicos). **RMN de ^{19}F** (CD_3Cl_3): δ -185.03 (ddd, $J = 8.5, 5.6$ e 25.4 Hz, 4F, Ar-*m*-F), -184.03 (ddd, $J = 8.5, 2.8$ e 24.0 Hz, 2F, Ar-*m*-F), -183.64 (ddd, $J = 8.5, 2.8$ e 24.0 Hz, 2F, Ar-*m*-F), -175.26 (t, $J = 22.6$ Hz, 2F, Ar-*p*-F), -174.91 (t, $J = 22.6$ Hz, 2F, Ar-*p*-F), -160.82 (dd, $J = 8.5$ e 22.6 Hz, 2F, Ar-*o*-F), -160.42 (td, $J = 8.5$ e 42.3 Hz, 4F, Ar-*o*-F), 158.82 (dd, $J = 8.5$ e 25.4 Hz, 2F, Ar-*o*-F). **UV-Vis** (CH_2Cl_2) λ_{max} (%): 410 (100); 504 (12); 595 (4); 609 (4) 653 (29) nm.

2.4.2.7. Síntese da clorina 2.9



A uma solução de clorina **2.7** (99.6 mg, 0,1 mmol) em dimetilformamida seca (5 mL) foram adicionadas 4-mercaptopiridina (51.3 mg, 0.4mmol, 4.0 eq.) e dietilamina (1 mL). Essa mistura foi mantida sob agitação durante 1h sob atmosfera de azoto, à temperatura ambiente. Após a evaporação da DMF, sob pressão

reduzida, o componente maioritário da mistura foi separado através de cromatografia em camada fina preparativa, usando diclorometano/metanol (96:4) como eluente, tendo sido identificado como sendo a clorina **2.9**. A clorina **2.9** (105.9 mg, 79%) foi cristalizada numa mistura de diclorometano:hexano. **RMN de ^1H** ($\text{DMSO}-d_6$): δ -1.7 (s, 2H, -NH), 2.24 (s, 3H, N- CH_3), 2.64-2.67 (m, 2H, H-pirrolidina), 3.13-3.18 (m, 2H, H-pirrolidina), 5.36-5.39 (m, 2H, β -pirrólicos), 7.29-7.34 (m, 8H, Py-*o*-H), 8.49 (d, $J = 5.0$ Hz, 2H, β -pirrólicos), 8.58 (s, 2H, β -pirrólicos), 8.62-8.64 (m, 8H, Py-*m*-H), 8.81 (d, $J = 5.0$ Hz, 2H, β -pirrólicos). **RMN de ^{19}F** ($\text{DMSO}-d_6$): δ -159.07 (dd, $J = 25.4$ e 12.7 Hz, 2F, Ar-F), -158.34 a -158.60 (m, 4F, Ar-F), -157.04 (dd, $J = 25.4$ e 12.7 Hz, 2F, Ar-F), -154.31 a -154.44 (m, 4F, Ar-F), -153.43 a -153.57 (m, 2F, Ar-F), -153.08 (dd, $J = 24.0$ e 12.7 Hz, 2F, Ar-F). **ESI-MS** (m/z): 466.05 (M^{3+}), 698.58 (M^{2+}).

2.4.1.1. Cationização da clorina 2.9

A uma suspensão de clorina **2.9** (40.9 mg) em DMF (4 mL) foi adicionado iodeto de metilo, em largo excesso (2 mL). A mistura reacional foi mantida sob agitação, a 40 °C, durante a 36 h. Após este período, a mistura foi arrefecida e o produto precipitado com éter etílico. O precipitado foi filtrado e lavado com éter etílico. Após a reprecipitação, o composto foi

filtrado e dissolvido em metanol, lavado com diclorometano e reprecipitado (três vezes), numa mistura de metanol/diclorometano. A clorina metilada **2.10** foi filtrada, lavada com diclorometano e seca sob vácuo originando um pó esverdeado (42.7 mg, 99%).

RMN de ^1H (CD_3OD): δ 3.21 (s, 3H, N- CH_3 -pirrolidina), 3.64 (s, 3H, N- CH_3 -pirrolidina), 3.93 (s, 2H, H-pirrolidina), 4.43 (s, 12H, Py-N- CH_3), 4.60 (s, 2H, H-pirrolidina), 6.21 (s, 2H, β -H), 8.22 (s, 8H, Py-*o*-H), 8.85 (s, 8H, Py-*m*-H), 8.96 (s, 2H, β -H), 9.01 (d, J = 4.2 Hz, 2H, β -H), 9.38 (d, J = 4.2 Hz, 2H, β -H). **RMN de ^{19}F** (CD_3OD): δ de - 158.46 a -160.49 (m, 8F, Ar-F), de -152.04 a -155.11 (m, 8F, Ar-F).

UV-Vis (DMSO) λ_{max} (ϵ): 409 (5.30), 503 (4.22), 597 (3.83) e 650 (4.63) nm.

Capítulo III

Avaliação Biológica dos Derivados Catiônicos

3.1. Introdução

A terapia fotodinâmica antimicrobiana tem-se revelado uma abordagem bastante promissora na inativação de vários microrganismos patogénicos. Esta técnica faz uso de compostos fotossensíveis, como os derivados tetrapirrólicos, e da luz visível na indução da oxidação das biomoléculas dos microrganismos, provocando morte celular (Figura 3.1). Tal abordagem tem mostrado ser uma alternativa promissora à administração de medicamentos sistémicos, no tratamento de infeções localizadas, sendo uma das suas principais vantagens o facto de fotoinativarem microrganismos multirresistentes, e de até então não serem conhecidos estudos que revelem que os microrganismos desenvolvem resistência ao tratamento *via* fotoinativação.¹¹⁵

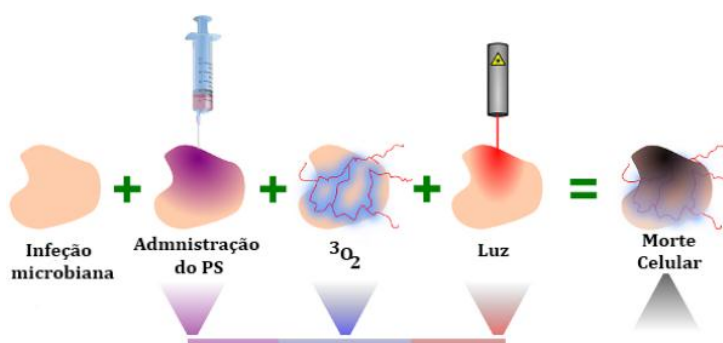


Figura 3.1 – Esquema ilustrativo da aplicação do efeito fotodinâmico no tratamento de doentes infetados com microrganismos patogénicos.¹¹⁶

Uma das principais aplicações deste tipo de inativação diz respeito ao tratamento de doenças dermatológicas. De entre as espécies que normalmente colonizam a pele humana, podem-se realçar as estirpes bacterianas *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, organismos capazes de desenvolver resistência a antibióticos de famílias diferentes. As infeções na pele representam uma das principais causas de morte de doentes imunocomprometidos hospitalizados (*S. aureus*, 75% e *P. aeruginosa*, 25%).¹¹⁵

A estrutura dos PSs está diretamente associada ao grau de eficiência do processo fotodinâmico, nomeadamente quando comparados os resultados obtidos para uma estirpe Gram (-) e Gram (+). Como já explicado no capítulo I, a estirpe Gram (+) é muito mais suscetível ao processo fotodinâmico devido, principalmente, ao facto de apresentar uma parede celular menos complexa que a da Gram (-). (Figura 3.2).

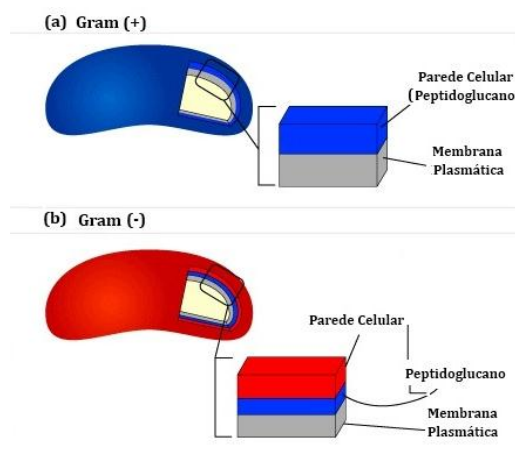


Figura 3.2 – Representação esquemática resumida da parede celular da estirpe bacteriana Gram (+) (a) e Gram (-) (b).

Tal como mostrado no capítulo I, vários são os estudos que as comprovam que porfirinas e clorinas tetra-arilsubstituídas inativam, eficazmente, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Dado que a fonte de luz é um dos factores que permite o desencadeamento do efeito fotodinâmico, e que uma fonte de irradiação de comprimento de onda mais elevado, permite o tratamento de lesões mais profundas, vários autores têm publicado estudado a fotoinativação na presença de luzes da região do vermelho.⁹²

Neste capítulo serão apresentados os resultados de fotoinativação de dois dos derivados cujas sínteses foram apresentadas no capítulo anterior, usando uma fonte de irradiação de luz branca e outra de luz vermelha. Neste capítulo foram feitos também estudos fotofísicos (oxigénio singuleto, rendimento quântico de fluorescência e fotoestabilidade) dos referidos derivados sob as mesmas condições dos ensaios de inativação fotodinâmica.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Fotossensibilizadores

Nos ensaios de aPDT foram testados dois dos derivados catiônicos descritos no capítulo anterior, **2.5** e **2.10**, doravante designados de fotossensibilizadores **PS1** e **PS2**, respetivamente (Figura 3.3). Dado que para uma melhor avaliação do potencial dos novos PSs porfirínicos, os seus resultados devem ser comparados com os obtidos com outros PSs do mesmo tipo, foi usado como referência o **PS3**, amplamente estudado em aPDT.

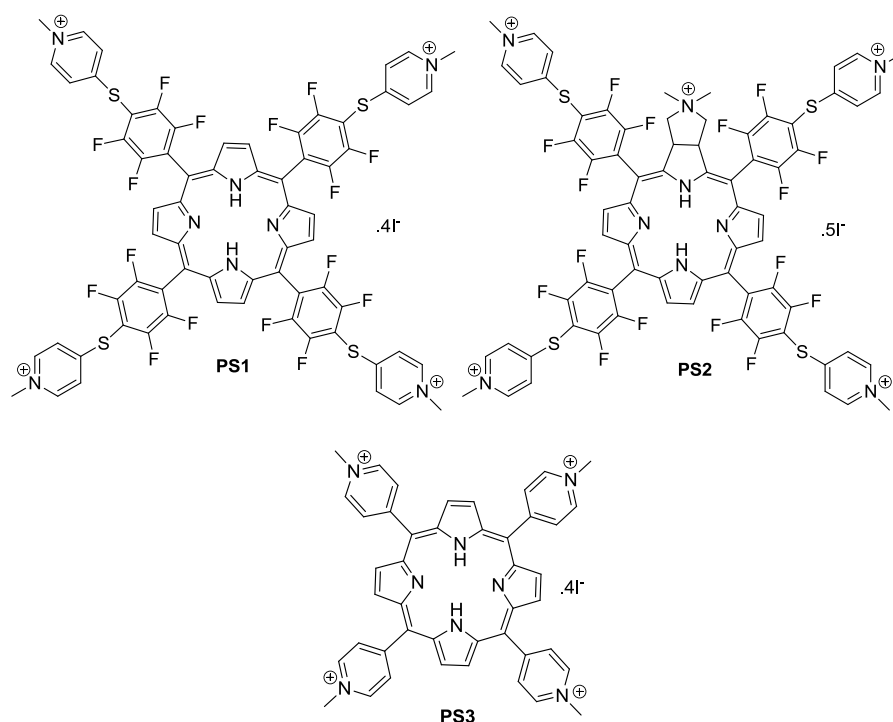


Figura 3.3 – Representação estrutural de cada PS testado (PS1, PS2, PS3).

3.2.2. Estirpes bacterianas, condições de crescimento e preparação das suspensões stock

As estirpes bacterianas testadas, *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativa), ambas resistentes a antibióticos, foram isoladas de pacientes dos Hospitais da Universidade de Coimbra, foram de exsudados de ferida não cirúrgica. Ambas as estirpes foram identificadas e os seus perfis de suscetibilidade a antibióticos caracterizados, recorrendo a um *kit* BioMerieux Vitek[®] 2. As estirpes bacterianas foram mantidas congelados, a -20 °C, em 40% de glicerol. As culturas de uso mais frequente foram mantidas em *Tryptic Soy Agar* (TSA, Merck), em placas de petri, à temperatura de 4 °C. As culturas usadas cresceram em *Tryptic Soy Broth* (TSB, Merck), incubadas a 37 °C, tendo sido repicadas duas vezes antes, de cada ensaio. A primeira repicagem foi realizada por inoculação de uma colónia isolada, da placa de TSA, em 5 mL de TSB, e incubada a 37 °C durante 24h. A partir desta cultura foram inoculados 100 µL em 10 mL de TSB, que foi incubado a 37 °C durante 24 h. Antes de cada ensaio foi retirada uma alíquota de 100 µL da segunda suspensão bacteriana que foi inoculada num erlenmeyer de 100 mL em 10 mL de TSB, incubada a 37 °C, durante 16 horas. Todo este processo foi realizado sob condições de assepsia, e tendo em vista a obtenção de uma densidade ótica de ≈ 0.8 a 590 nm.

3.2.3. Ensaios de aPDT

As suspensões bacterianas a irradiar foram preparadas a partir das suspensões incubadas durante a noite ($\approx 10^9$ UFC.mL⁻¹, D.O. ≈ 0.8 a 590 nm), por diluição de 1/10 em tampão salino de fosfacto (PBS: 4g de NaCl, 0.1g de KCl, 0.12 g de KH₂PO₄, 0.72 g de Na₂KPO₄, para um volume final de 500 mL de H₂O, a um pH 7.4 ± 0.2), $\approx 10^8$ UFC.mL⁻¹. Em cada ensaio foi colocado, assepticamente, para copos de vidro de 100 mL esterilizados. 1 mL da suspensão bacteriana, um determinado volume de PS (da solução *stock* de 500 μ M) de modo a obter as concentrações finais de 0.5 μ M, 1 μ M, 5 μ M ou 10 μ M. O volume final de cada copo foi acertado a 10 mL por adição de PBS. Após adição do derivado tetrapirrólico, os copos foram protegidos da luz com papel de alumínio e sujeitos a um período pré-incubação de 15 minutos no escuro sob agitação (≈ 100 rpm), à temperatura ambiente (25-27 °C).

3.2.4. Condições de irradiação

Após o período de pré-incubação, as amostras foram expostas à luz branca ou à luz vermelha (usando a mesma fibra ótica que a usada para a luz branca. acoplada a um filtro de corte que permitiu a passagem da radiação apenas da gama de comprimentos de onda de 530-800 nm – “filtro laranja”), com uma intensidade de 150 mW.cm⁻² (medida por um medidor de luz LI-COR Modelo LI-250, Li-Cor inc., EUA), por 15, 60 ou 90 minutos (dependendo do PS e da estirpe bacteriana testada) a 25-27 °C, sob agitação magnética. Este procedimento foi realizado para cada um dos três derivados catiônicos, sob luz branca e vermelha para as duas estirpes bacterianas estudadas.

3.2.5. Quantificação das unidades formadoras de colónias (UFCs)

A inativação fotodinâmica de cada estirpe foi avaliada em várias amostras colhidas durante o período de incubação. O teor de bactérias foi determinado através da determinação das unidades formadoras de colónias (UFCs). As amostras foram diluídas em PBS e semeadas, em duplicado, em TSA por incorporação. As UFCs foram determinadas na melhor diluição após 18-24 horas de incubação a 37 °C. O teor de bactérias é expresso em UFC.mL⁻¹. Para cada tipo de ensaio foram realizados três ensaios independentes. Os resultados foram apresentados em gráficos do logaritmo das

unidades formadoras de colónias por mililitro [$\log (\text{UFC}.\text{mL}^{-1})$] em função do tempo de irradiação, em minutos.

3.2.6. Controlos

Em cada ensaio realizado foram incluídos controlos: controlo escuro e controlo claro. O controlo claro consistiu numa suspensão bacteriana em PBS (sem PS) que foi sujeita às mesmas condições de irradiação das amostras. Os controlos escuros apresentavam a mesma composição que as amostras, tendo permanecido protegidos da luz com papel de alumínio durante todo o ensaio. Os controlos foram submetidos ao mesmo período de pré-incubação que as amostras testadas.

3.2.7. Estudos de fotoestabilidade dos fotossensibilizadores testados

Uma alíquota da solução de cada PS (500 μM) foi diluída em 3 mL de PBS, numa célula de vidro (absorvência ≈ 1), foi irradiada nas mesmas condições usadas nos ensaios biológicos (fibra ótica de luz branca, 400-800 nm e luz vermelha 530-800 nm (usando a mesma fibra ótica que a luz branca acoplada a um filtro de corte que permitiu a passagem da radiação apenas desta gama – “filtro laranja”), 150 $\text{mW}.\text{cm}^{-2}$ durante 60 e 90 minutos, respetivamente), à temperatura ambiente e sob agitação magnética. O espectro de absorção de cada amostra foi registado a cada minuto, durante o tempo de irradiação máximo testado, a fim de avaliar a estabilidade dos compostos face às luzes usadas. Cada ensaio foi realizado em duplicado.

A Intensidade da radiação foi medida com um potenciómetro bright Spectra Physics, modelo 407A e o sensor da mesma marca, modelo 407A-2.

3.2.8. Estudos de agregação

A avaliação da solubilidade dos **PS₁** e **PS₂** foi realizada em DMSO e PBS recorrendo à espectroscopia de UV-Vis. Para tal foram analisadas várias concentrações, entre 0.5 e 6 μM , preparadas por adição de alíquotas sucessivas de cada solução *stock* dos derivados tetrapirrólicos. Após as análises representou-se graficamente a intensidade da banda Soret em função da concentração de PS para averiguar se os dados obtidos seguiam a lei de Beer-Lambert.

3.2.9. Estudos de geração de oxigênio singuleto

Uma alíquota de 2 mL de uma solução do derivado porfirínico ($0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) e 1,3-difenilisobanzofurano (DPBF, $50 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) em DMF/ H_2O (9:1) foi irradiada com um “array” de LEDs com emissão de luz entre λ 610-780 nm, com uma intensidade de $9.0 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$, numa cuvete de vidro, à temperatura ambiente e sob agitação suave. As soluções *stock* de DPBF foram preparadas com uma concentração de $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ em DMF/ H_2O (9:1). O decaimento da absorção do DPBF a 415 nm foi medido em intervalos de tempo até 15 min. A percentagem de decaimento da absorção é proporcional à produção de $^1\text{O}_2$, tendo sido calculado pela comparação da absorvência inicial da solução e a absorvência registada após o período de irradiação.

A intensidade da radiação foi medida com um potenciômetro bright Spectra Physics, modelo 407A e o sensor da mesma marca, modelo 407A-2.

3.2.10. Rendimento quântico de fluorescência

O rendimento quântico de fluorescência (RQF) dos PSs, em DMF, foi calculado por comparação da área abaixo do espectro de emissão corrigido (Área_{PS}) com a da *meso*-(tetrafenil)porfirina (TPP). A TPP foi, portanto, usada como padrão de fluorescência ($\lambda = 532 \text{ nm}$) com o RQF de 0.12 em DMF. Todos os compostos, incluindo a referência, foram analisados com 0.02 de intensidade de absorvência para o comprimento de onda de excitação. Os rendimentos quânticos de fluorescência foram calculados usando a Equação 3.1, abaixo apresentada:

$$RQF = RQF_{\text{TPP}} \cdot \frac{\text{Área}_{\text{PS}} \cdot (1 - 10^{-A_{\text{PS}}(532\text{nm})})}{\text{Área}_{\text{TPP}} \cdot (1 - 10^{-A_{\text{TPP}}(532\text{nm})})}$$

Equação 3.1 – Expressão matemática usada para o cálculo do rendimento quântico de fluorescência (RQF) de cada fotossensibilizador (PS), em que “ Área_{PS} ” representa o valor da área abaixo do espectro de emissão do PS, “ Área_{TPP} ” representa o valor da área abaixo do espectro de emissão da *meso*-(tetrafenil)porfirina (TPP), A representa a intensidade de absorvência para o comprimento de onda de excitação (532 nm), para o PS e para a TPP.

3.2.11. “Uptake”

Uma suspensão bacteriana ($\approx 10^8$ células.mL⁻¹) foi incubada durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente com a mesma concentração de PS que foi usada para os estudos de fotoinativação. As células foram recuperadas por centrifugação (140 rpm, durante 15 min) e, após remoção da solução do PS por sucção, o *pellet* foi dissolvido por digestão em 1.0 mL de uma solução aquosa de dodecilo sulfato de sódio (SDS) 2%, obtendo-se uma solução homogênea. A concentração de PS foi obtida através de análises espectrofotométricas, num intervalo de 600-800 nm, após excitação a 406 (**PS2**), 411 (**PS1**) e 423 (**PS3**) nm, e calculadas por interpolação, usando uma curva de calibração, previamente construída com concentrações conhecidas de cada derivado tetrapirrólico em SDS 2%.

Tendo em vista a determinação da concentração de células viáveis de cada estirpe (CFU.mL⁻¹), alíquotas das suspensões bacterianas incubadas foram diluídas em série e plaqueadas em, em triplicado, em TSA.

3.3. Resultados

3.3.1. Ensaios de fotoinativação de estirpes bacterianas

3.3.1.1. *S. aureus* e *P. aeruginosa* sob irradiação de luz branca

Nesta subseção serão descritos os estudos de fotoinativação da estirpe *S. aureus* e *P. aeruginosa* sob ação de luz branca (150 mW.cm⁻²). A cinética de inativação da *S. aureus* durante o período de irradiação de 60 minutos, na presença do **PS1**, **PS2** e **PS3** (usado como referência), está representada na Figura 3.4a. Os resultados mostram-nos que em 15 minutos de irradiação, com o **PS2** numa concentração de 0.5 µM, ocorreu a inativação completa (até ao limite de detecção) de *S. aureus*. Da análise da referida figura podemos também notar que ao fim dos 15 minutos de irradiação, os dois outros PSs, numa concentração de 1 µM, induziram a redução de 6.2 log e 4.5 log, para o **PS1** e **PS3**, respetivamente, ocorrendo a inativação completa após 60 minutos de irradiação. Estes resultados demonstram que o PS do tipo clorina, não só inativou até ao limite de detecção a estirpe *S. aureus*, usando metade da concentração testada para os restantes PSs, num período de tempo quatro vezes menor. A cinética de inativação da *P. aeruginosa* (Figura 3.4b) durante o período de irradiação de 60 minutos, na presença do **PS1**, **PS2** e **PS3**, mostrou que o processo de inativação ficou praticamente completo ao

fim de 60 minutos de irradiação, para todos os PSs testados. O **PS3**, numa concentração de 5 μM , promoveu a inativação da estirpe Gram (-) quase até o limite de detecção (redução de 7.9 log), ao passo que o **PS1** e **PS2** foi necessário uma concentração de 10 μM para a obtenção de uma taxa de inativação semelhante, fotoinativando 6.6 e 7.6 log, respetivamente.

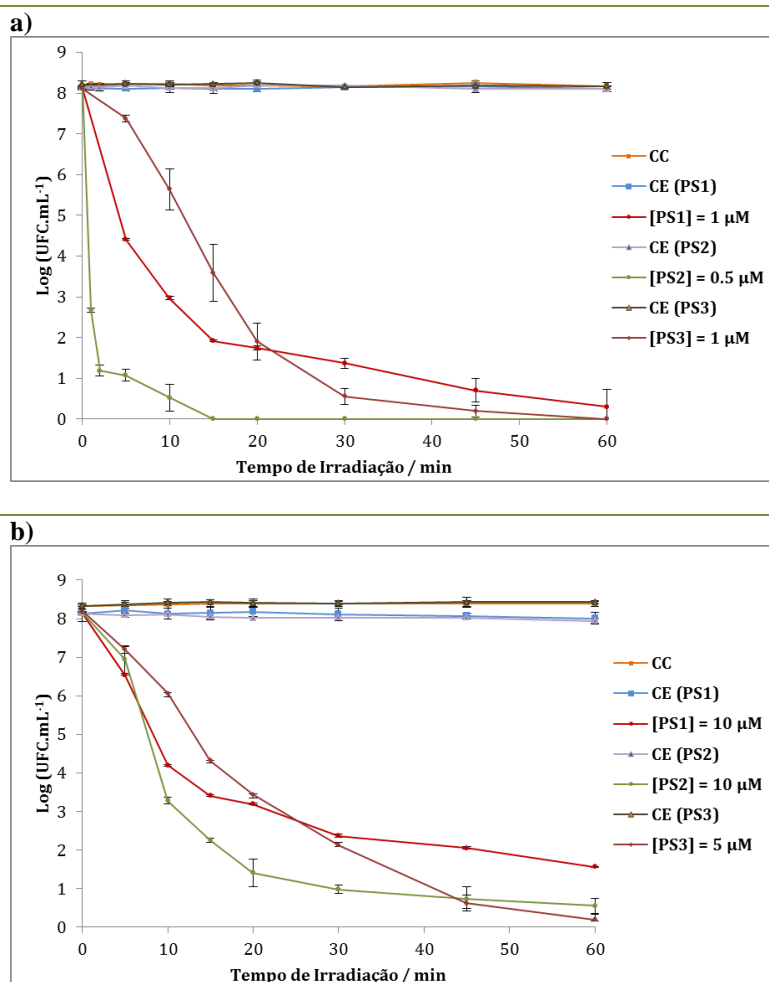


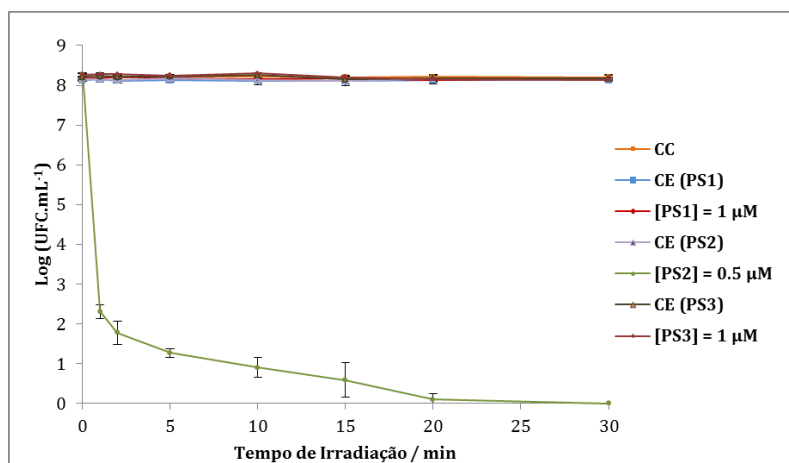
Figura 3.4 – Variação do teor de: **a)** *S. aureus*, **b)** *P. aeruginosa*, na suspensão bacteriana durante os ensaios de fotoinativação com o **PS1** (1 μM e 10 μM , respetivamente), **PS2** (0.5 μM e 10 μM , respetivamente), e **PS3** (1 μM e 5 μM , respetivamente), usando luz branca (150 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$). Todos os valores correspondem à média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

3.3.1.2. *S. aureus* e *P. aeruginosa* sob irradiação de luz vermelha

A cinética de fotoinativação da *S. aureus* sob radiação de luz vermelha (150 $\text{mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) com os **PS1**, **PS2** e o **PS3**, como agentes fotossensibilizadores, durante o período de irradiação de 30 minutos, é representada na Figura 3.5a. Da análise dos resultados é possível denotar que o **PS2**, mesmo testado numa concentração duas vezes menor (0.5 μM) que as dos restantes fotossensibilizadores (PSs), foi o único que

inativou até ao limite de detecção, 8 log, a estirpe bacteriana. Os PSs do tipo porfirina não promoveram qualquer taxa de inativação em *S. aureus* (para a concentração de 1 μM), não se distinguindo o perfil de inativação com estes PSs dos obtidos para os controlos durante todo o período de irradiação.

a)



b)

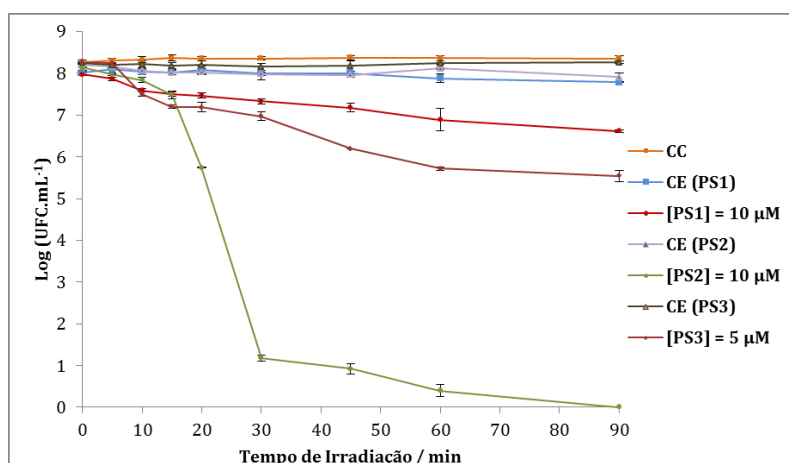


Figura 3.5 – Variação do teor de: **a)** *S. aureus*, **b)** *P. aeruginosa* durante os ensaios de fotoinativação, com o **PS1** (1 μM e 10 μM , respetivamente), **PS2** (0.5 μM e 10 μM , respetivamente), e **PS3** (1 μM e 5 μM , respetivamente), usando luz vermelha (150 $\text{mW} \cdot \text{cm}^{-2}$). Todos os valores correspondem à média de três ensaios independentes. As barras de erro representam o desvio padrão.

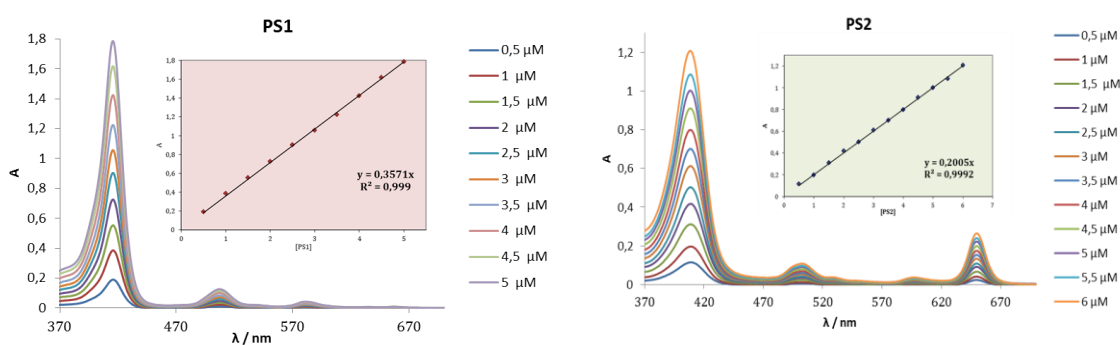
Os resultados referentes ao processo de fotoinativação da estirpe *P. aeruginosa*, com os três PSs testados, durante um período de irradiação de 90 minutos estão apresentados na Figura 3.5b. A análise da Figura 3.5b demonstra que o **PS2** numa concentração de 10 μM permitiu a inativação até ao limite de detecção da estirpe Gram (-), ao fim de 90 minutos de irradiação com luz vermelha, sendo de realçar que a maior

redução bacteriana obteve-se após 30 minutos de irradiação. O **PS₃** (5 μM) permitiu uma redução de cerca de 3 log da concentração de células viáveis, ao passo que o **PS₁** (10 μM) possibilitou a inativação de apenas 1.4 log, ao fim de 90 minutos de irradiação.

3.2.2. Estudos de agregação e fotoestabilidade dos PSs testados

De modo a avaliar a solubilidade do **PS₁** e **PS₂** em DMSO e PBS foram realizadas análises espectroscópicas de UV-vis. Para tal, foram analisadas soluções de concentrações compreendidas entre 0.5 μM a 5 μM , para o **PS₁**, e 0.5 μM a 6 μM , para o **PS₂**. Com os dados obtidos representou-se graficamente a regressão linear da intensidade da banda Soret em função da concentração de fotossensibilizador (PS), de modo a confirmar se os resultados seguem a lei de Beer-Lambert (Figura 3.6). Os resultados obtidos mostram que os dois PSs, em DMSO, se mantêm em solução, uniformemente distribuídos, ou seja, não agregam. Quanto à solubilidade em PBS, segundo o procedimento utilizado, os dois PSs apresentaram resultados que seguem a Lei de Beer-Lambert, ou seja, não sugerem fenómenos de agregação, por aumento da concentração.

a)



b)

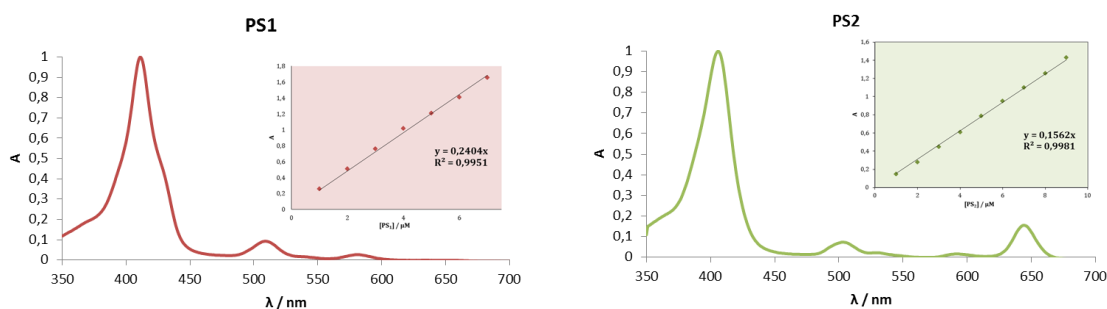


Figura 3.6 – Estudos de Agregação dos **PS₁** e **PS₂** em a) DMSO e b) em PBS.

Dado que é a fonte de irradiação que desencadeia o início do processo fotodinâmico, a estabilidade dos PSs à luz é um parâmetro que deve ser monitorizado de modo a garantir que a espécie fotossensibilizadora se mantém ao longo de todo o processo. Assim, de modo a avaliar a taxa de fotodegradação dos compostos testados, foram realizados estudos de fotoestabilidade em condições de irradiação semelhantes às utilizadas nos ensaios biológicos, luz branca (Figura 3.7a) e luz vermelha (Figura 3.7b), 150 mW.cm^{-2} . Soluções dos PSs **PS1**, **PS2** e **PS3** em PBS foram irradiadas com luz branca e vermelha, estando os resultados obtidos apresentados na Tabela 3.1.

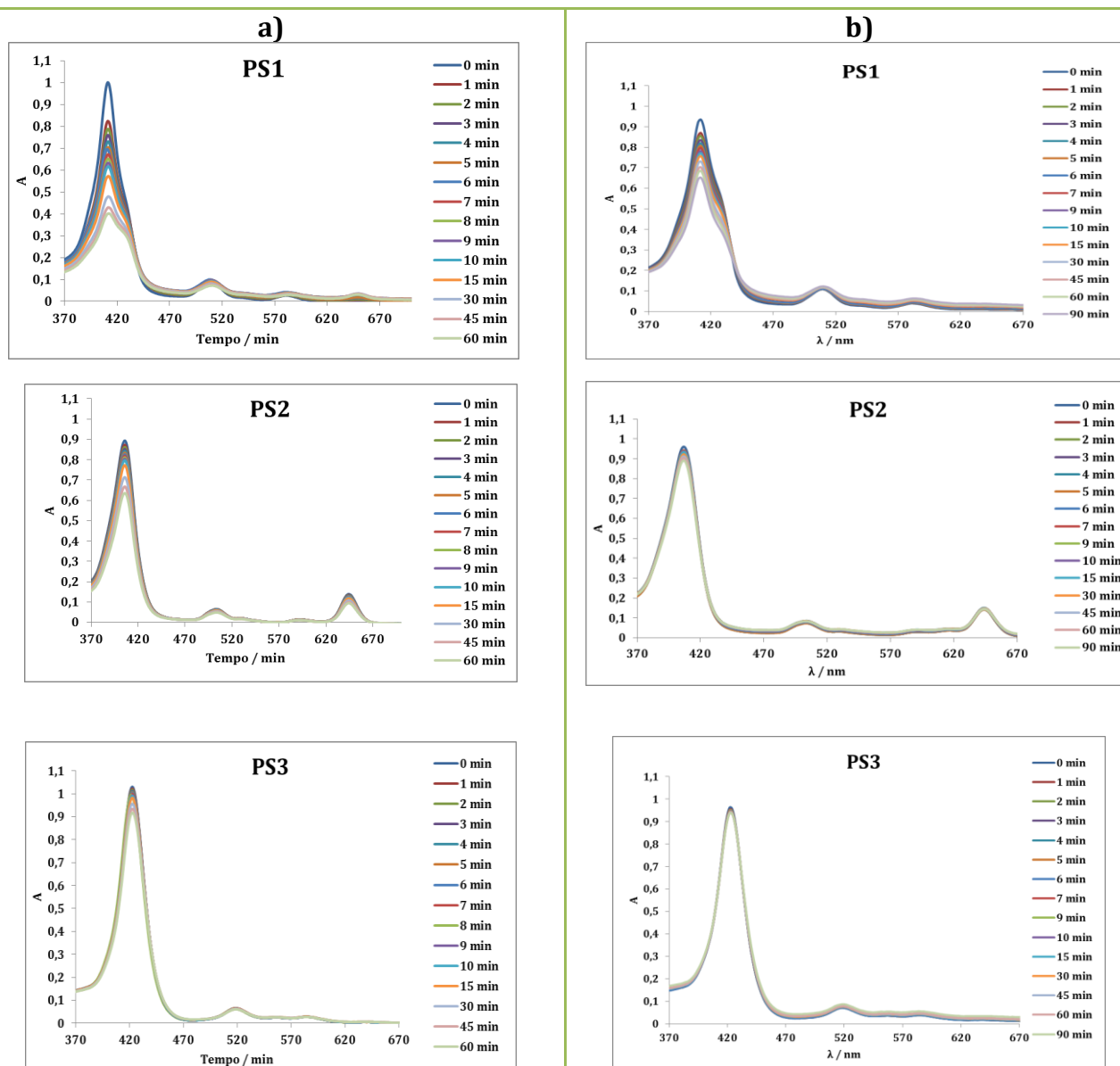


Figura 3.7 – Espectros de absorvência dos PSs **PS₁**, **PS₂** e **PS₃** em PBS após irradiação com: a) luz branca, b) luz vermelha, ambas com uma intensidade de 150 mW.cm^{-2} , por diferentes períodos de tempo.

Os resultados obtidos revelam que o PS mais estável é o **PS3** que sofre a redução da intensidade máxima banda Soret de apenas 11%, para luz branca (60 min), e 3% para a luz vermelha (90 min). O **PS2** sofre uma redução da intensidade da banda Soret de 19% na luz branca e de 7% na luz vermelha (90 min).

Tabela 3.1 – Fotoestabilidade dos fotossensibilizadores (PSs) testados após irradiação com luz branca e vermelha (150 mW.cm^{-2}) após vários períodos de tempo. Os resultados são apresentados em percentagem, calculados através da razão entre absorvência inicial e a absorvência depois da irradiação, em cada período de tempo. A absorvência foi medida no comprimento de onda correspondente à banda Soret, para cada PS, em PBS.

		Tempo de Irradiação (min)															
PS		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	30	45	60	90
PS1	Luz branca	100	82	79	76	73	70	69	67	65	63	62	57	48	43	40	-
PS2		100	98	96	95	94	93	92	92	91	90	89	86	80	75	71	-
PS3		100	99	99	98	98	98	97	97	96	96	96	95	93	91	89	-
PS1	Luz Vermelha	100	93	91	89	88	86	85	85	85	84	82	81	78	75	73	70
PS2		100	98	98	97	97	97	98	98	98	98	98	97	96	95	94	93
PS3		100	99	99	99	98	98	98	99	99	99	98	98	98	98	97	97

O mesmo ensaio foi realizado na ausência de luz, de modo a poder avaliar sobre uma possível existência de agregação da porfirina **PS1**, ao longo do tempo. Como podemos observar na Figura 3.8 ocorre redução da intensidade da banda Soret do espectro de UV-vis da porfirina, mesmo na ausência de luz, o que prova a ocorrência de fenómenos de agregação. Após 30 min na ausência de luz ocorre a redução de cerca de 7% da intensidade inicial da banda Soret do espectro UV-vis do PS₃ e após 8 horas a redução atinge os 50%. Após 5 minutos no ultrassons não sofre qualquer alteração. Após 24 horas, a leitura da intensidade máxima da banda Soret sofre nova redução, não sofrendo qualquer alteração por ação de calor.

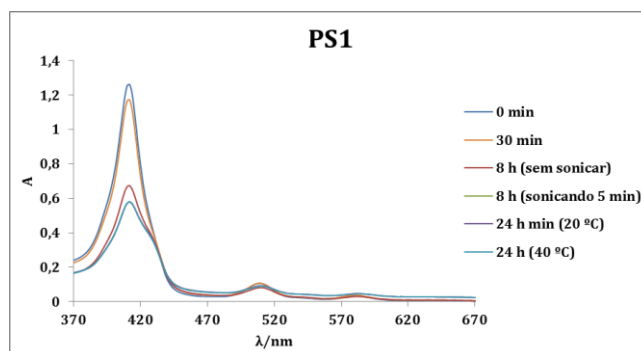


Figura 3.8– Espectros de absorvência do **PS1**, em PBS, na ausência de luz, ao fim vários períodos de tempo, com ou sem sonicar, com ou sem aquecimento.

3.3.2. Estudos de produção de oxigénio singuleto

Um outro parâmetro crucial que intervém no processo de inativação fotodinâmico é a produção de oxigénio singuleto por parte das espécies fotoexcitáveis. A capacidade dos derivados tetrapirrólicos produzirem oxigénio singuleto foi estimado qualitativamente através do registo do decaimento da absorção do 1,3-difenilisobanzofurano (DPBF) a 415 nm. Os testes efetuados foram realizados em DMF/H₂O (9:1), um solvente de polaridade que permite a dissolução conjunta do PS (0.5 µM) e do DPBF (50 µM). Os resultados obtidos estão apresentados no Figura 3.9.

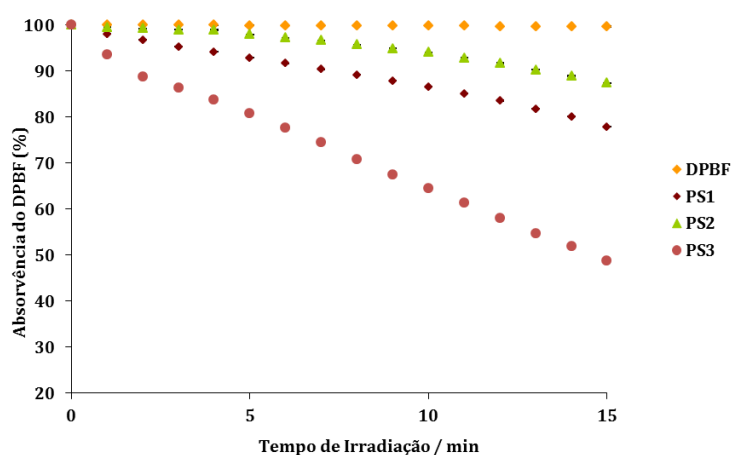


Figura 3.9 – Decaimento relativo da absorção, como medida da fotoxidação do DPBF (50 µM) em DMF/H₂O (9:1) após irradiação com luz vermelha de um array de diodos (610 nm > λ < 780 nm, 9.0 mW.cm⁻²) com e sem os fotossensibilizadores (**PS1**), (**PS2**) e (**PS3**) (0.5 µM). Os valores apresentados correspondem à média de duas experiências independentes.

Pela observação da Figura 3.9 é possível verificar que o **PS3** é, o melhor gerador de oxigénio singuleto, promovendo um decrescimento de cerca de 50% na absorção do DPBF (após 15 min de irradiação), ao passo que o **PS1** e **PS2** geram, respetivamente, cerca de 22% e 13%, não sendo, portanto geradores de oxigénio singuleto tão bons.

3.3.3. Rendimento quântico de fluorescência

Uma das características dos macrociclos tetrapirrólicos é apresentarem capacidade de emitir fluorescência. Assim foi calculado o rendimento quântico de fluorescência (RQF) dos PSs **PS1**, **PS2** e **PS3**. Recorrendo a um espectralfluorímetro foram construídos os espectros de emissão de fluorescência, em DMF, e os respetivos RQF calculados por comparação com o espectro de emissão da *meso*-(tetrafenil)porfirina

(TPP), segundo a Equação 3.1, apresentada no ponto 3.2.10. Os valores de RQF dos PSs **PS1** e **PS2** estão apresentados na Tabela 3.2, na qual é possível observar que o **PS2** apresenta um RQF quatro vezes superior ao RQF do **PS1**.

Tabela 3.2 – Rendimento quântico de fluorescência (RQF) do **PS1** e **PS2**, e **PS3**, em DMF.

PS	DO a 532 nm	RQF
PS1	0.021	0.01
PS2	0.020	0.04
PS3	0.020	0.02
TPP (referência) em DMF		0.12

3.3.4. “Uptake”

Tomando partido da capacidade dos derivados tetrapirrólicos testados emitirem fluorescência, foi calculada a concentração de cada PS obtida por interpolação, usando uma curva de calibração, previamente construída com concentrações conhecidas para cada derivado tetrapirrólico. O “uptake” dos PSs, **PS1**, **PS2** e **PS3**, por parte de cada estirpe bacteriana (*S. aureus* e *P. aeruginosa*), foi realizado nas mesmas concentrações que as usadas na incubação dos ensaios de fotoinativação.

Os resultados obtidos (Figura 3.10) mostram que para as duas estirpes bacterianas o PS que apresenta maior “uptake” é o **PS1** (3.41×10^6 moléculas(PS).UFC⁻¹ para a *S. aureus* e 2.60×10^7 moléculas(PS).UFC⁻¹ para a *P. aeruginosa*). A clorina **PS2** (8.16×10^5 moléculas(PS).UFC⁻¹ para a *S. aureus* e 7.88×10^6 moléculas(PS).UFC⁻¹ para a *P. aeruginosa*) e por último o **PS3**. (6.83×10^4 moléculas(PS).UFC⁻¹ para a *S. aureus* e 8.24×10^5 moléculas(PS).UFC⁻¹ para a *P. aeruginosa*).

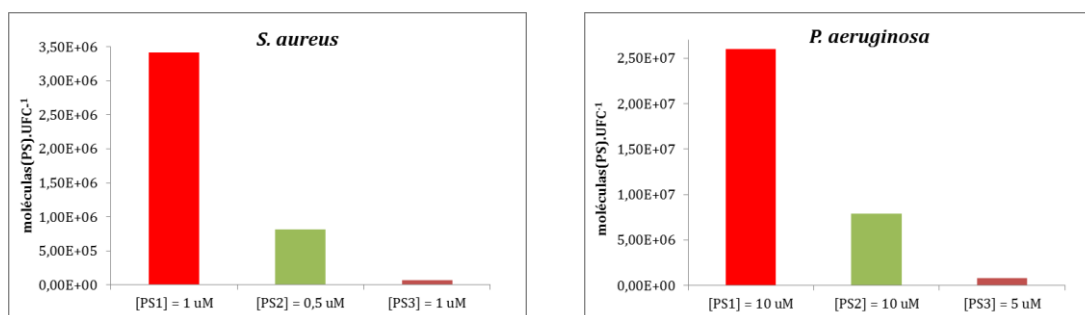


Figura 3.10 – “Uptake” [moléculas(PS).UFC⁻¹] dos PSs **PS1**, **PS2** e **PS3** para cada uma das estirpes testadas (*S. aureus* e *P. aeruginosa*), após 15 minutos de incubação na ausência de luz, sob agitação (≈ 100 rpm), a 25 °C.

3.4. Discussão

Neste trabalho foi estudada a capacidade de uma porfirina tetra-catiônica (PS₁) e uma clorina (PS₂) penta-catiônica inativarem duas estirpes bacterianas resistentes a antibióticos (*S. aureus* e *P. aeruginosa*), por ação de luz branca e de luz de comprimento de onda da região do vermelho ($530 > \lambda < 800$ nm), usando uma intensidade de 150 mW.cm⁻². Os mesmos estudos foram também realizados para uma porfirina já conhecida (PS₃), amplamente utilizada como modelo comparativo de inativação fotodinâmica de microrganismos.

No que diz respeito aos ensaios de inativação, nenhum dos compostos se revelou tóxico na ausência de luz, dado que não se verificou alteração significativa do número de células viáveis na suspensão de cada estirpe bacteriana, nas concentrações testadas para cada PS. De entre as duas estirpes a mais suscetível ao processo de inativação é a estirpe Gram (+), sendo inativada até ao limite de deteção (≈ 8 log) num período de tempo mais reduzido e na presença de concentrações de PS mais reduzidas. Esta maior suscetibilidade, comparativamente com a estirpe Gram (-), está intimamente relacionada com a menor complexidade da sua parede celular, permitindo assim, que o PS estabeleça uma ligação mais forte com o microrganismo.

Inicialmente serão discutidos os resultados para as cinéticas de inativação obtidas sob a fonte de irradiação de luz branca. Para a estirpe *P. aeruginosa*, a estirpe Gram (-), o PS mais eficiente foi o **PS3**, inativando-a até ao limite de deteção (≈ 8 log), numa concentração de 5 μ M, após 60 min de irradiação. Este facto deverá estar relacionado com a maior capacidade deste PS produzir oxigénio singuleto, comparativamente com os restantes. Os restantes fotossensibilizadores apresentam resultados semelhantes, inativando a estirpe bacteriana quase até ao limite de deteção, numa concentração de 10 μ M, após 60 minutos. Tendo em conta este resultado e dado que a produção de oxigénio singuleto por parte do **PS1** (22 %) é superior à do **PS2** (13 %) seria de esperar que este último apresentasse um “uptake”, consideravelmente, maior que o primeiro. Contudo, tal não é apoiado pelos resultados obtidos neste trabalho (2.60×10^7 moléculas(PS).UFC⁻¹ para **PS1**, e 7.88×10^6 moléculas(PS).UFC⁻¹, para **PS2**). Este facto pode ser devido a possíveis fenómenos de agregação por parte do **PS1**, em PBS. Estes fenómenos de agregação parecem não ocorrer devido ao aumento da concentração do PS em solução, mas sim, pelo aumento do período de permanência deste (numa concentração constante) em PBS. Quanto à estirpe Gram (+), *S. aureus*, o

PS mais eficaz foi o **PS2**, inativando-a até ao limite de deteção, numa concentração de 0.5 μM em 15 minutos, ao passo que para os restantes foi necessária a concentração de 1 μM em cerca de 60 minutos. A maior eficiência do **PS2** em relação à do **PS3** pode ser explicada pelo maior “uptake” do primeiro (8.16×10^5 moléculas(PS).UFC⁻¹), comparativamente com o do segundo (6.83×10^4 moléculas(PS).UFC⁻¹), mesmo realizado com metade da concentração de PS. Os resultados de “uptake” e oxigénio singuleto não apoiam, novamente, a diferença entre as cinéticas de inativação obtidas para **PS1** e **PS2**. Contudo este facto pode ser também explicado por fenómenos de agregação.

No que diz respeito aos dados obtidos no processo de fotoinativação na presença da luz vermelha todos os parâmetros inerentes aos ensaios de foram mantidos. O **PS2**, o derivado do tipo clorina, revelou ser o mais eficaz na inativação de ambas as estirpes bacterianas, inativando-as até ao limite de deteção. Estes resultados podem ser explicados pelo facto de o **PS2** apresentar um espectro de absorção da região do visível característico, no qual a quarta banda Q (pertencente à região do vermelho) é cerca de dez vezes superior à das porfirinas (**PS1** e **PS3**). Tal comportamento faz com que este PS apresente uma maior absorção quando comparada com os restantes PSs (**PS1** e **PS3**).

A eficiência do **PS3** perante a do **PS1** pode ser justificada, para além da maior produção de oxigénio por parte do primeiro, como pelos fenómenos de agregação apresentados pelo segundo, em PBS.

Capítulo IV

Conclusões

Neste trabalho foram sintetizados derivados tetrapirrólicos do tipo porfirina (**2.2** e **2.3**) e do tipo clorina (**2.7** e **2.9**). Todos estes compostos foram sintetizados a partir da **TPPF₂₀**, originando derivados tetra-substituídos. O composto **2.2** foi obtido por substituição nucleofílica aromática dos quatro átomos de flúor das posições *para* da porfirina de partida, por grupos mercaptopiridilo, com um rendimento de 90%. Contrariamente ao sucedido com o composto **2.2**, a reação de substituição nucleofílica aromática com 4-hidroxipiridina ocorre pelo átomo de azoto e não pelo oxigénio, com formação de um grupo carbonilo na posição 4' do anel piridona formado, num rendimento de 14%. O derivado do tipo clorina **2.7** foi sintetizado através da redução de uma unidade pirrólica da **TPPF₂₀**, *via* cicloadição 1,3-dipolar usando a sarcosina e o paraformaldeído como precursor do 1,3-dipolo interveniente, num rendimento de 37%. Por sua vez a clorina **2.9** teve origem na clorina **2.7** a qual foi funcionalizada com mercaptopiridina num rendimento de 80%. Tendo em vista a aplicação biológica dos derivados tetrapirrólicos **2.2**, **2.3** e **2.9**, estes foram cationizados, originando os derivados tetra-catiónicos **2.5** e **2.6**, e o derivado penta-catiónico **2.10**, respetivamente.

Dos derivados sintetizados apenas os compostos **2.5** (**PS1**), **2.10** (**PS2**) foram avaliados biologicamente e testados em ensaios de inativação de duas estirpes bacterianas (*S. aureus* e *P. aeruginosa*). Para além destes dois PSs foi ainda testada a 5,10,15,20-tetraquis(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirina tetra-iodada (**PS3**).

Os estudos de aPDT mostraram que esta técnica é uma boa opção na inativação de microrganismo patogénicos, visto que ambas as estirpes, mesmo sendo resistentes a antibióticos, não apresentam resistência à inativação fotodinâmica antimicrobiana a baixas concentrações de PS. Pode-se também concluir que a estirpe do tipo Gram (+) apresenta maior sensibilidade ao processo de fotoinativação que a estirpe do tipo Gram (-), como esperado.

Quanto aos PSs testados, o derivado do tipo clorina mostrou ser o mais eficaz, na inativação da estirpe Gram (+), inativando-a até ao limite de deteção numa concentração e tempo inferiores aos das porfirinas. Este mesmo derivado revelou também resultados promissores inativando, quase até ao limite de deteção, a estirpe Gram (-) (10 µM, 60 min), para a luz branca e até ao limite de deteção (10 µM, 90 min), para a luz vermelha. Assim a luz vermelha mostrou ser promissora quando combinada com PSs de “2.^a geração” do tipo clorina, no tratamento de infeções mais profundas provocadas por microrganismos do tipo referido.

Quanto aos estudos de agregação e fotoestabilidade realizados, pode concluir-se que o **PS1** agrega em PBS, não por aumento da sua concentração, mas sim com o tempo de permanência neste solvente. Relativamente ao **PS3**, este mostrou ser fotoestável ao longo do período e condições de irradiação testadas, já o **PS2** apresentou uma maior taxa de degradação (29%).

Referências

1. Katritzky, A. R., Charles W., *Comprehensive Heterocyclic Chemistry*, Pergman Press, Oxford, **1984**, vol. 3.
2. Milgrom, L., *An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*, Oxford University Press, New York, **1997**.
3. Cavaleiro, J. A. S., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., *Arkivoc* **2003**, 14, 107
4. Manso, C., Freire, A., Azevedo, M. *Introdução à Bioquímica Humana*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, **1986**.
5. Pandey, R. K., Zheng, G., *The Porphyrin Handbook- Applications: Past, Present and Future*, editado por Kadish, K. M.; Smith, K. M.; Guillard, R., Academic Press, New York, **2000**, vol. 6.
6. Ortega, Y. R., Toledano, C. A., Rosales, D. R., Sandoval A. S., Vergara, E.G., Ulloa, R. Z., *J. Chem. Soc.* **1998**, 667.
7. Murakami, Y., Kikuchi, J., Hisaeda, Y., Hayashida, O., *Chem. Soc. Rev.* **1996**, 96, 721.
8. Solladie, N., Hamel, A., Gross, M., *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 6075.
9. Tian, H. J., Inoue, K., Yoza, K., Ishi-I, T., Shinkai, S., *Chem. Lett.* **1998**, 871.
10. Carre, V., Gaud, O., Sylvain, I., Bourdon, O., Spiro, M., Blais, J., Granet, R., Krausz, P., Guilloton, M., *J. Photochem. Photobiol. B.* **1999**, 48, 57.
11. Ben Amor, T., Tronchin, M., Bortolotto, L., Verdiglione, R., Jori, G., *Photochem. Photobiol.* **1998**, 67, 206.
12. Cavaleiro, J. A. S., Smith, K. M., *Rev. Port. Quím.* **1989**, 31, 29.
13. Milgrom, L. R., O'Neill, F., *The Chemistry of Natural Products*, R. H. Thomson (Ed.), Blackie Academic & Professional, Londres, **1993**, cap. 8, pag. 329.
14. Pandey, R. K., Zheng, G., Referência 5, cap. 43.
15. Milgrom, L. R., *The Colours of Life*, Oxford University Press, Oxford, **1997**.
16. Groves, J. T., *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2000**, 4, 350.
17. Moss, G. P., *Pure Appl. Chem.* **1987**, 59, 6, 779.
18. Silva, A. M. G., *Tese de Doutoramento*, Universidade de Aveiro, **2002**.
19. Jaquino, L., *The Porphyrin Handbook*, Kadish K. M., Smith K.M., Guillard R. (Eds.), Academic Press: San Diego, **2000**, vol. 1.
20. Scheer, H., J., Katz, J. *Porphyrins and Metalloporphyrins*, editado por K. M. Smith, Elsevier Scientific Publishing Company, Amesterdão, **1975**.
21. Merritt, J. E., Loening, K. L., *Pure Appl. Chem.* **1979**, 51, 2251.
22. Janson, T. R., Katz, J. J., *The Porphyrins – Physical Chemistry, Part B*, D. Dolphin (Ed), Academic Press, Nova Iorque, **1979**, vol. 4, cap. 4.
23. Smith, K. M., *Comprehensive Organic Chemistry-The Synthesis and Reactions of Organic Compounds*, editado por Barton, D.; Ollis, W. D., Pergamon Press, Oxford, **1979**.
24. Cowan, J. A., *Inorganic Biochemistry: an introduction*, Wiley-VCH: New York, **1997**.
25. Vicente, M. G. H., Referência 22, cap. 4.

-
26. Tomé, J. P. C., Tese de Doutorado, Universidade de Aveiro, **2001**.
 27. Lehninger, A. L., Nelson, D. L., COX, M. M., *Princípios de Bioquímica*, 2ª edição, Sarvier Editora. S.P. **1995**, 529.
 28. Pichon-Santander, C., Santander, P. J., Scottvo, A. I., *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14, 3904.
 29. Rothmund, P., *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, 57, 2010.
 30. Adler, A. D., Longo, F. R., Finarelli, J. D., Goldmacher, J., Assour, J., Korsakoff, L., *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 476.
 31. Lindsey, J. S., Referência 22, cap 2.
 32. Lindsey, L. S., Schreiman, I. C., Hsu, H. C., Kearney, P. C., Marguerattaz, A. M., *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 827.
 33. Gonsalves, A. M. d'A. R., Varejão, J. M. T. B., Pereira, M. M., *J. Heterocycl. Chem.* **1991**, 28, 635.
 34. De Paula, R., Faustino, M. A. F., Pinto, D. C. G. A., Neves, M. G. P. M. S., Cavaleiro, J. A. S., *J. Heterocycl. Chem.* **2008**, 45, 453.
 35. Calvete, M. J. F., Gomes, A., *Virtual Quím.* **2009**, 1, 192.
 36. Sternberg, E. D., Dolphin, D., *Tetrahedron* **1998**, 54, 4151.
 37. Gravier, J., Schneider, R., Frochot, C., Bastogne, T., Schmitt, F.; Didelon, J., Guillemin, F., Barberi-Heyob, M., *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 3867.
 38. Gonsalves, A. M. d'A., Serra, A. C., *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 4192.
 39. Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., M. Soncin, M. Magaraggia, S. Ferro, Jori, G., *Med. Chem.* **2004**, 47, 6649.
 40. Callot, H. J., Johnson, A. W., Sweeney, A. J., *Chem. Soc. Rev.* **1973**, 1, 1424.
 41. DiNello, R. K.; Dolphin, D. J., *Org. Chem.* **1980**, 45, 5196.
 42. Vicente, M. G. H., Tomé, A. C., Walter, A., Cavaleiro, J. A. S., *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3639.
 43. Silva, A. M. G., Tomé, A. C., Neves, M. G. P. M. S., Silva, A. M. S., Cavaleiro, J. A. S., *Chem. Commun.* **1999**, 1767.
 44. (a) Dondoni, A., Franco, S., Juniquera, F., Merchain, F., Merino, P., Tejero, T., Vinodu, M., Gao, R., Drain, C. M., *Synth. Commun.* **1994**, 24, 2537. (b) Singh, S., Aggarwal, A., Thompson, S., Tomé, J. P. C., Zhu, X., Samaroo, D., *Bioconj. Chem.* **2010**, 21, 2136 (c) Hirohara, S., Obata, M., Alitomo, H., Sharyo, K., Ando, T., Tanihara, M., Yano, S., *J. Photochem. Photobiol.* **2009**, 33, 9722.
 45. Pandey, R. K. J., *Porphyrins Phthalocyanines* **2000**, 4, 368.
 46. Silva, J. N., Silva, A. M. G., Tomé, J. P. C., Ribeiro, A. O., Domingues, M. R. M., Cavaleiro, J. A. S., Silva, A. M. S., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Serra, O. A., Bosca, F., Filipe, P., Santus, R., Morlière, P., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, 7, 834.
 47. Huisgen, R., *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, Wiley Interscience: New York, Nova Iorque, **1984**.
 48. Silva, A. M. G., Tomé, A. C., Neves, M. G. P. M. S., Cavaleiro, J. A. S., Perrone, D., Dondoni, A. *Synlett* **2005**, 857.

-
49. (a) Desjardins, A., Flemming, J., Sternberg, E. D., Dolphin, D., *Chem. Commun.* **2002**, 2622. (b) Silva, A. M. G., Tomé, A. C., Neves, M. G. P. M. S., Cavaleiro, J. A. S., *Synlett* **2002**, 1155.
 50. Zhang, C., Trudell, M. L., *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7189.
 51. Ostrowski, S., Wyrebek, P., Mikus, A., *Heterocycles* **2006**, 68, 885.
 52. Séverac, M., Pleux, L. L., Scarpaci, A., Blart, E. Odobel, F., *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 6518.
 53. Carvalho, C. M. B., Gomes A. T. P. C., Fernandes, S. C., Prata, A. C. B., Faustino, M. A. F., Tomé, J. P. C., Neves, M.G. P.M. S., Tomé, A. C., Lin, Z., Rainho, J. P., Almeida, M. A., Cunha, M. A., Rocha, J., Cavaleiro, J. A. S., *J. Photochem. Photobiol. B.* **2007**, 88, 112.
 54. Tomé, J. P. C., Silva, E. M. P., Pereira, A. M. V.M., Alonso, C. M. A., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Tavares, S. A. P., Duarte, R. R., Caeiro, M. F., Valdeira, M. L., *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 4705
 55. Bonnet, R., *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, Gordon and Breach Science Publishers, Londres, **2000**.
 56. Jori, G., Perria, C., *Photodiagnosis and Phototherapeutic Techniques in Medicine*, Documento Editoriale srl, Milão, **1995**.
 57. Wang, X., Tamiakir, H., *Energ. Environ. Sci.* **2010**, 3, 94.
 58. Tavares, A., Carvalho, C. M. B., Faustino, M. A., Neves, M. G. M. S., Tomé, J. P. C., Tomé, A. C., J., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, M. A., Gomes, N. C. M., Alves, E., Almeida, M. A., *Mar. Drugs* **2010**, 8, 91.
 59. Policard, A., *Soc. Biol.* **1924**, 91, 1423.
 60. Lipson, R. L., *Proc. 9th International Cancer Congress*, Tokio, Japan **1966**, 393.
 61. Jori, G., *EPA Newsletter* **1997**, 60, 12.
 62. Fisher, A. M. R., Murphee, A. L., Gomer, C. J., *Lasers Surg. Med.* **1995**, 17, 2.
 63. Calzavara-Pinton, P. G., *J. Photochem. Photobiol. B* **1995**, 29, 53.
 64. Charlesworth, P., Truscott, T. G., Kessel, D., Medforth, C. J., Smith, K. M., *J. Chem. Soc.* **1994**, 90, 1073.
 65. Weinstein, G. D., McCullough, J. L., Nelson, J. S., Berns, M. W., *Invers. Dermatol.* **1991**, 96, 573.
 66. Abramson, A. L., Shikowitz, M. J., Mullooly, V. M., Steinberg, B. M., Amella, C. A., Rothstein, H. R., *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **1992**, 118, 25.
 67. Meulen, V. d., Ibrahim, F. W., Sterenborg, K., Alphen, H. J. C. M., Maikoe, L. V., Dankert, A. J., *Photochem. Photobiol.* **1997**, 40, 204.
 68. DeRosa, M. C., Crutchley, R. J., *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 233, 351.
 69. Raab, O., *Zeit für Biol.* **1900**, 39, 524.
 70. Fleming, A., *J. Exp. Patol.* **1929**, 10, 22.
 71. Choi, M. S., Yun, S. J., Beom H. J., Park, H. R., Lee, J. B., *J. Dermatol.* **2011**; 38, 661.
 72. Friedman, M., Friedland, G.W., *Medicine's Ten Greatest Discoveries*, Yale University Press, New Heaven, **1998**, 263.
 73. Walsh, C., *Antibiotics: Actions, Origin, Resistance*, ASM Press, Washington, **2003**.
 74. Wright, C.H.T., Reynolds, K. A., *Curr. Opin. Microbiol* **2007**, 10, 447.
-

-
75. Holzgrabe, U., Dingermann, T., Zündorf, I., *Pharm. Unserer Zeit* **2006**, 35, 388.
 76. Chabrier-Rosello, Y., Foster, T. H., Mitra, S., Haidaris, C. G., *J. Photochem. Photobiol.* **2008**, 84, 1141.
 77. Jin, H., Huang, X., Chen, Y., Zhao, H., Ye, H., Huang, F., Xing, X., Cai, J., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 88, 761.
 78. Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Soncin, M., Magaraggia, M., Ferro, S., Jori, G., *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 6649.
 79. Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Mendonça, A. F., Pegado, I. N., Duarte, R., Valdeira, M. L., *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 3878.
 80. Gomes, M. C., Woranovicz-Barreira, S. M., Faustino, M. A. F., Fernandes, R., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Newton C. M. Gomes, Almeida, A., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A., Tomé, J. P. C., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, DOI: 10.1039/c1pp05174a.
 81. Almeida, A., Cunha, A., Faustino, M. A. F., Tomé, A. C., Neves, M. G. P. M. S., in *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications*, editado por Hamblin, M. R., Jori, G., Royal Society of Chemistry, Padova, **2011**, cap. 5.
 82. Nucci, V., Torchia, D., Cappugi, P., *Clin. Infect. Dis.* **2009**, 48, 1330.
 83. (a) Argyris, E. G., Vanderkooi; J. M., Paterson, Y., *Eur. J. Biochem.* **2001**, 268, 925. (b) Vanyur, R., Heberger; K., Jakus, J., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, 43, 1829. (c) Dairou, J., Vever-Bizet; C., Brault, D., *Antiviral Res.* **2004**, 61, 37. (d) Cheng, Y., Tsou, L. K., Cai, J., Aya, T., Dutschman, G. E., Gullen, E. A., Grill, S. P., Chen, A. P. C., Lindenbach, B. D., Hamilton; A. D., Cheng, Y. C., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, 54, 197.
 84. Costa, L., Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., M. A. F. Faustino, Cunha, A., Gomes, Newton C. M., A., Almeida, *Antiviral Res.* **2011**, 91, 278.
 85. Alves, E., Carvalho, C. M. B., Tomé, J. P. C., M. A. F. Faustino, Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A., Mendo, S., Almeida, A., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, 35, 1447.
 86. Alves, E., Costa, L., Carvalho, C., Tomé, J. P. C., M., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S., A. C. Tomé, J. A. S. Cavaleiro, Cunha, A., Almeida, A., *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 9, 70.
 87. Carvalho, C. M., Alves, E., Costa, L., Tomé, J. P., Faustino, M. A., Neves, M. G., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A., Almeida, A., Cunha, A., Lin, Z., Rocha, J., *ACS Nano* **2010**, 12, 7133.
 88. Gomes, M. C., Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro, **2011**.
 89. Lee, L. S., Thong, P. S. P., Olivo, M., Chin, W. W. L., Ramaswamy, B., Kho, K. W., Lim, P. L., Lau, W. K. O., *Photodiag. Photodyn.* **2010**, 7, 213.
 90. Garcia, G., Sol, V., Lamarche, F., Granet, R., Guilloton, M., Champavier, Y., Krausz, P., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 3188.
 91. Gil-Tomás, J., Dekker, L., Narband, N., Parkin, I. P., Nair, S. P., Street, C., Wilson, M., *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 4189.
 92. Huang, L., Zhiyentayev, T., Xuan, Y., Azhibek, D., Kharkwal, G. B., Hamblin, M. R., *Lasers in Surgery and Medicine* **2011**, 43, 313.
-

-
93. Dai, T., Tegos, G. P., Lu, Z., Huang, L., Zhiyentayev, T., Franklin, M. J., Baer, D. G., Hamblin, M. R., *Antimicrob. Agents Ch.* **2009**, 53, 3929.
 94. Kranz S., Guellmar, A., Völpe, A., Gitter, B., Albrecht, V., Siguusch, B. W., *Lasers in Surgery and Medicine* **2011**, 43, 241.
 95. Park, J., Moon, Y., Bang, I., Kim, Y., Kim, S., Yoon, J., *Lasers Med. Sci.* **2010**, 25, 705.
 96. Hamblin, M. R., Hasan, T., *Photochem. Photobiol. Sci.* **2004**, 3, 436.
 97. Soukos, N. S., Ximenez-Fyvie, L. A., Hamblin, M. R., Socransky, S. S., Hasan, T., *Antimicrob. Agents Ch.* **1998** 42, 2595.
 98. Fujimoto, K., Miyata, T., Aoyama, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 3558.
 99. <http://www.prof2000.pt/users/biologia/tcolgram.htm>.
 100. <https://wikispaces.psu.edu/display/Bio110nk/Prokaryotes+II+-+Structure+and+Function>.
 101. Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., Monnet, D.L. *Sex. Transm. Dis.* **2011**, 11, 1056.
 102. Vitkauskienė, A., Naginiene, R., Pavilonis, A., *Med. Lit.* **2011**, 3, 133.
 103. Maishm T., *Med. Chem.* **2009**, 9, 974.
 104. Nakonieczna, J., Michta, E., Rybicka, M., Grinholc, M., Gwizdek-Wiśniewska, A., Bielawski, K. P., *BMC Microbiol.* **2010**, 10, 323.
 105. Schastak, S., Ziganshyna, S., Gitter, B., Wiedemann, P., Claudepierre, T., *PLoS one* **2010**, 5, 11674.
 106. Jori, G., Fabris, C., Soncin, M., Ferro, S., Coppelotti, O., Dei, D., Fantetti, L., *Lasers in Surgery and Medicine* **2006**, 38:468.
 107. Reddi, E., Ceccon, M., Valduga, G., Jori, G., Bommer, J. C., Elisei, F., Latterini, L., Mazzucato, U., *Photochem. Photobiol.* **2002**, 75, 462.
 108. <http://www.tutorvista.com/content/chemistry/chemistry-iii/atomic-structure/electromagnetic-nature-light.php>.
 109. <http://www.uni-leipzig.de/~pwm/web/?section=introduction&page=fluorescence>.
 110. Simplicio, F. I., Maionchi, F., Hioka, N., *Quim. Nova* **2002**, 25, 80.
 111. Gomes, A. T. P. C., Cunha, C. A., Domingues, R. M. R., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Silva, A. M. S., Santos, F. C., Souza, M. C. B. V., Ferreira, V. F., Cavaleiro, J. A. S., *Tetrahedron* **2011**, 67, 7336.
 112. Castro, M. C. R., Tese de Mestrado, capítulo 2.
 113. Ferreira, B. S., Silva, F. C., Pinto, A. C., Gonzaga, T. G.D., Ferreira, V. F., *J. Heteroatom. Chem.* **2009**, 46, 1080.
 114. Vinhado, F. S., Gandini, M. E. F., Iamamoto, Y., A. M.G. Silva, Simões, M. M., Q., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., S., Rebelo, L. H., Pereira, A. M.V.M., Cavaleiro, J. A. S., *J. Mol. Catal. A- Chem.* **2005**, 239 138.
 115. S., Banfi, Caruso, E., Buccafurni, L., Battini, V., S., Zazzaron, Barbieri, P., Orlandi, V., *J. Photochem. Photobiol. B.* **2006**, 85.
 116. <http://www.atomic.physics.lu.se/index.php?id=21287&type=98&L=2>.
-